

DER HERZGLYKOSID-REZEPTOR
KONTRAHIERENDER
HÜHNERHERZ-MUSKELZELLEN
IN KULTUR

Bernhard Zwissler

*Diss
München
1985*

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

DER HERZGLYKOSID-REZEPTOR KONTRAHIERENDER

HÜHNERHERZ-MUSKELZELLEN IN KULTUR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

BERNHARD ZWISSLER

aus München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Werdan

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1985

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG	1
1.1. Wirkungsmechanismus der Herzglykoside	1
1.2. Kontrahierende Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur - Ein geeignetes Untersuchungsobjekt der experimentellen Kardiologie?	7
1.2.1. Vorteile isolierter Herzmuskelzellen in Kultur als Versuchsobjekt der experimentellen Kardiologie	8
1.2.2. Pharmakologische, biochemische und zellphysiologische Eigenschaften isolierter Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur	12
1.2.3. Inwieweit lassen sich die an kultivierten, embryonalen Hühnerherz-Muskelzellen erhobenen Befunde auf intaktes, adultes Herzgewebe übertragen?	13
1.3. Zielsetzung und Fragestellung	17
2. METHODEN UND MATERIALIEN	18
2.1. Untersuchungen an intakten Hühnerherzellen in Kultur	18
2.1.1. Präparation und Kultivierung von Muskelzellen	18
2.1.2. Präparation und Kultivierung von Bindegewebszellen	20
2.1.3. Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung an Hühnerherzzellen	21
2.1.3.1. Zeitabhängige Bindung und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin	22

	Seite
2.1.3.2. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin	23
2.1.3.3. Unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin	23
2.1.4. Messung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten in Hühnerherzzellen	24
2.1.5. Messung der zellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte	26
2.1.6. Bestimmung der Anzahl von Herzglykosid-Bindungsstellen in Hühnerherzzellen	27
2.2. Untersuchungen an isolierten Zellmembranen aus embryonalen Hühnerherzen	28
2.2.1. Präparation der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase enthaltenden Zellmembranen	28
2.2.2. Messung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität	29
2.2.3. Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung	29
2.3. Inkubationslösungen	30
2.4. Materialien	31
3. ERGEBNISSE	32
3.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzzellen in Kultur und an isolierte Zellmembranen des embryonalen Hühnerherzens	32
3.1.1. Zeitabhängige Bindung und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin	32
3.1.2. Einfluß der Hitzedenaturierung auf die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle	33
3.1.3. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin: Scatchard Plot	37

	Seite
3.1.4. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung	42
3.1.4.1. Bestimmung der Assoziationsrate k_{+1}	43
3.1.4.2. Bestimmung der Dissoziationsrate k_{-1}	46
3.1.4.3. Einfluß der Temperatur auf die ^3H -g-Strophanthin-Bindung	47
3.1.5. Einfluß von K^+ -Ionen auf die ^3H -g-Strophanthin-Bindung	50
3.1.5.1. Abhängigkeit der ^3H -g-Strophanthin-Bindung von der extrazellulären K^+ -Konzentration	50
3.1.5.2. Einfluß von K^+ -Ionen auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin	51
3.1.5.3. Einfluß von K^+ -Ionen auf die Geschwindigkeitskonstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung	52
3.1.6. Aktivierungsenergien der ^3H -g-Strophanthin-Bindung	58
3.1.7. Zahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen in der intakten Hühnerherzzelle	59
3.2. Einfluß von g-Strophanthin auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$	59
3.2.1. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch g-Strophanthin in Hühnerherz-Zellmembranen	60
3.2.2. Hemmung des aktiven $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-Transportes}$ durch g-Strophanthin in Hühnerherz-Zellkulturen	61

- 3.2.2.1. Auswirkung von g-Strophanthin auf die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme

- 3.2.2.2. Auswirkung von g-Strophanthin auf den intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalt

- 3.3. Korrelation von g-Strophanthin-Bindung, Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase und intrazellulärem K^+ -Gehalt

4. DISKUSSION

- 4.1. Existiert ein spezifischer Herzglykosid-Rezeptor in Hühnerherzzellen in Kultur?

- 4.1.1. Charakterisierung der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Hühnerherzzellen

- 4.1.1.1. Bindungskinetik

- 4.1.1.2. Affinität von g-Strophanthin zur Bindungsstelle

- 4.1.1.3. Kalium-Abhängigkeit der Bindung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen

- 4.1.1.4. Selektivität der g-Strophanthin-Bindungsstelle für Herzglykoside

- 4.1.1.5. Zahl der spezifischen Herzglykosid-Bindungsstellen

- 4.1.1.6. Sind Artefakte durch Internalisierung von ^3H -g-Strophanthin in der intakten Hühnerherzzelle auszu-schließen?

	Seite
4.1.1.7. Die Bindung von ^3H -g-Strophanthin in Zellmembranpräparationen von kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen	89
4.1.2. Charakterisierung der Wirkung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen in Kultur	90
4.1.2.1. Die Aktivität der Na^+ -Pumpe in kultivierten Hühnerherzzellen	91
4.1.2.2. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin - Einfluß auf Zellelektrolyte	92
4.1.2.3. Steigerung der Kontraktilität durch g-Strophanthin	94
4.1.3. Schlußfolgerung	95
4.1.4. Der Herzglykosid-Rezeptor in Hühnerherz-Bindegewebszellen	96
4.2. Gibt es mehr als einen spezifischen Rezeptor für Herzglykoside in Hühnerherzzellen in Kultur?	98
4.3. Korrelation von g-Strophanthin-Rezeptor-Besetzung, Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und intrazellulärem K^+ -Gehalt	102
4.3.1. Unterschiedliches Kopplungsverhältnis von Herzglykosid-Bindung und Hemmung der Na^+ -Pumpe in Muskel- und Bindegewebszellen des Hühnerherzens	106
4.3.1.1. Erklärungsmöglichkeiten	106
4.3.1.2. Schlußfolgerungen	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	113
6. LITERATURVERZEICHNIS	115

1. EINLEITUNG

1.1. Wirkungsmechanismus der Herzglykoside

Herzwirksame Glykoside werden spätestens seit dem Erscheinen des berühmt gewordenen Buches von William Withering "An account of the foxglove and some of its medical uses with practical remarks on dropsy and other diseases" (292) im Jahre 1785 wirkungsvoll zur Behandlung der "Wassersucht" eingesetzt (125). Auch heutzutage sind Digitalisglykoside als ein wesentlicher Bestandteil bei der Therapie der hydropischen Herzinsuffizienz anerkannt (14, 86). Langjähriger Gebrauch und intensive Forschungsarbeiten haben dazu geführt, daß uns pharmakologische und toxische Effekte dieser Medikamentengruppe gut bekannt sind. Dieses Wissen täuscht jedoch darüber hinweg, daß bis heute kein Denkmodell gefunden wurde, welches - auf dem Boden von z. T. widersprüchlichen Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren - den genauen Wirkungsmechanismus der Herzglykoside befriedigend zu erklären vermag (82, 179, 184, 217). Einige grundlegende Fragen konnten jedoch in den letzten Jahren beantwortet werden.

So gilt heute der Herzmuskel und dort wiederum die einzelne Herzmuskelzelle als primäres Zielorgan der Glykosidwirkung (184, 194). Ausgehend von Untersuchungen von Cattell u. Gold, die im Jahre 1938 erstmals die positiv inotrope Wirkung von Herzglykosiden am Katzenpapillar-Muskel zeigen konnten (43), ist bis heute eine glykosidbedingte Zunahme der Kontraktilität an Herzmuskelpräparaten und Herzmuskel-Zellkulturen von unterschiedlichen Spezies wiederholt experimentell belegt worden (9, 38, 240). Herzglykoside entfalten ihre positiv inotrope Wirkung dabei sowohl am suffizienten als auch am insuffizienten Myokard (8), am Skelettmuskel sind sie nur in hohen Konzentrationen inotrop wirksam oder sogar wirkungslos (Überblick bei: 11, 30, 82, 258).

Eine Vielzahl möglicher Ursachen für die Kontraktionskraftzunahme unter kardioaktiven Steroiden wurde bisher untersucht und als kausaler Mechanismus ausgeschlossen. So konnte weder

eine Glykosidinteraktion mit kontraktilen Proteinen (Aktin, Myosin), Zellorganellen (Mitochondrien, sarkoplasmatisches Retikulum) oder zellulären Enzymen (Myosin-ATPase) noch ein direkter Glykosideffekt auf den Energiestoffwechsel des Herzwes nachgewiesen werden (8, 38, 82, 115, 214, 247). Eben-
sowenig existieren Hinweise für eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Proteine unter Glykosideinfluß (90, 155, 279). Zusammen mit den Ergebnissen, wonach intrazellulär applizierte Glykosidlösungen wirkungslos bleiben (41, 114), lassen diese Befunde einen primär intrazellulären Angriffsort für Herzglykoside als unwahrscheinlich, wenn auch nicht völlig ausgeschlossen erscheinen (146).

Mehr Aufschluß über das Wirkprinzip dieses Pharmakons als die oben erwähnten Studien erbrachten detaillierte Untersuchungen der Zellmembran und des transmembranalen Elektrolytaustausches. Seit langem ist bekannt, daß in der lebenden Zelle ein beträchtlicher Unterschied zwischen den intra- und extrazellulären Konzentrationen an Na^+ und K^+ -Ionen besteht (intrazellulär: $\text{Na}^+ = \text{ca. } 10 \text{ mM}$, $\text{K}^+ = \text{ca. } 150 \text{ mM}$; extrazellulär: $\text{Na}^+ = \text{ca. } 140 \text{ mM}$, $\text{K}^+ = \text{ca. } 5 \text{ mM}$). Diese transmembranale Kationendifferenz bricht - wie Harris im Jahre 1940 an Erythrozyten zeigen konnte (133) - bei Abkühlung der Zelle fast völlig zusammen, ist jedoch kurz nach deren Wiedererwärmung auf 37°C erneut meßbar. Dies war der erste Hinweis für die Existenz eines aktiven, d. h. gegen den Konzentrationsgradienten gerichteten Pumpmechanismus für Na^+ - und K^+ -Ionen über die Zellmembran ("Na⁺-Pumpe").

Verantwortlich für den aktiven Kationentransport ist ein im Jahre 1957 von J. C. Skou (253) im Axon des Tintenfisches entdecktes, membranständiges Enzym (102, 248, 291), das unter Verbrauch von Energie (ATP) den aktiven Transport von K^+ in die Zelle und Na^+ aus der Zelle gegen einen elektrochemischen Gradienten im Verhältnis von $\text{ATP}:\text{K}:\text{Na} = 1:2:3$ katalysiert (10, 116, 243, 255) und durch Na^+ und K^+ -Ionen aktiviert wird (8). Diese sogenannte $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierbare, Magnesium abhängige Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3.) kommt in hoher Aktivität im Nervengewebe, im Herzen sowie in Geweben mit sekretorischer

Funktion (Nieren, Plexus chorioideus, Corpus ciliare) vor (189) und gilt als Leitenzym der Zellmembran (213).

In den 50er Jahren konnte nun gezeigt werden, daß Herzglykoside sowohl den aktiven Kationentransport (Na^+ -Pumpe) in Erythrozyten als auch die Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in Membranhomogenaten spezifisch in äußerst geringen Konzentrationen zu hemmen vermögen (241, 253). Diese Beobachtungen wurden im folgenden an einer Vielzahl von Geweben einschließlich des Herzgewebes bestätigt (11, 13, 35, 57, 72, 74, 246, 254, 255). Neben ihrer positiv inotropen Wirkung konnte den kardioaktiven Steroiden somit erstmals eine zweite spezifische Wirkung zugeordnet werden. Repke und eine Reihe weiterer Autoren postulierten daraufhin die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase als den pharmakologischen Rezeptor für Herzglykoside und stellten die Hypothese einer kausalen Verknüpfung von Herzglykosid-Bindung, Hemmung der Na^+ -Pumpe und Herzwirksamkeit auf (115, 178, 229, 230). Für diese Hypothese sprach, daß die Affinität von Herzglykosiden für die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Präparationen aus Herzmuskelgewebe verschiedener Spezies (Ratte, Mensch, Hund u. a.) in direktem Verhältnis zu deren Glykosidempfindlichkeit in vivo stand (4, 66, 70, 269, 270) und auch die Hemmwirkung verschiedener Digitaloide auf die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in vitro mit ihrer positiv inotropen Potenz korreliert werden konnte (98, 135). Weitere Bestätigung erfuhr die "Rezeptor-Theorie" von Repke durch Untersuchungen mit radioaktiv markiertem g-Strophanthin und Digoxin, mit deren Hilfe die Existenz eines spezifischen Herzglykosid-Rezeptors auf der Membran der Herzzele auch direkt nachgewiesen werden konnte (19, 49, 73, 75, 76, 201, 202).

Genauere Analysen der Struktur der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase ergaben schließlich, daß es sich bei diesem Transportenzym um ein, die gesamte Zellmembran durchspannendes (2 α -Ketten, MG je 100 000 D, 2 β -Ketten, MG je 40000 D), Eiweißmolekül handelt. Sowohl die Transportfunktion (Na^+ -Pumpe) als auch die Bindungsstelle für Herzglykoside konnte den zwei benachbarten und von der Zellmembran nach außen ragenden α -Ketten (Polypeptide) zugeordnet werden, während die Funktion der β -Ketten (Glykoproteine)

teine) derzeit noch nicht geklärt ist (30, 121, 150, 167, 168, 237). Diese morphologischen Befunde korrelieren sehr gut mit Ergebnissen an Erythrozytenmembranen und isolierten Zellmembran-Präparationen verschiedener Organe und Spezies, wo bei gleichzeitiger Messung der spezifischen Glykosidbindung und der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase regelmäßig ein linearer Zusammenhang gefunden wurde, d. h. 10 % Rezeptorbesetzung führten zu 10 % Enzymhemmung, 50 % Rezeptorbesetzung führten zu 50 % Enzymhemmung etc. (13, 72, 74, 75, 106, 109, 130, 137, 141, 275). Ebenso stimmt die Vorstellung einer aus der Zellmembran in den Extrazellulärraum ragenden Einheit von Enzym und Rezeptor gut mit dem mehrmals erhobenen Befund überein, wonach Herzglykoside ihre hemmende Wirkung auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase nur dann entfalten können, wenn sie auf der Außenseite der jeweiligen Zellmembran angreifen können, wohingegen nach intrazellulärer Glykosidapplikation mit Ausnahme der noch unbestätigten Untersuchungen durch Isenberg (146) bisher keine Wirkung auf die Na^+ -Pumpe festgestellt werden konnte (41, 110, 140, 223, 224).

Die enge Korrelation von funktionellen (Pump-Hemmung, Inotropie), biochemischen (Bindung, Dissoziation) und morphologischen (Enzymstruktur) Parametern hat dazu geführt, daß heute die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase generell als das Rezeptorenzym für Herzglykoside angesehen wird (7, 117, 246, 248). Während die Genese der experimentell und klinisch häufig zu beobachtenden toxischen Digitaliseffekte mit einer massiven Hemmung der Na^+ -Pumpe und einer Depolarisation des Membranpotentials befriedigend erklärt zu sein scheint (11, 85), ist jedoch nach wie vor unklar, welche Reaktionsabläufe nach der Ausbildung des Glykosid-Rezeptor-Komplexes schließlich zu der für die Kraftsteigerung nötigen (214) und wiederholt gemessenen Zunahme an freien Ca^{2+} -Ionen im Zellinneren (176, 178, 179, 232, 251) führen.

Mehrere Theorien werden gegenwärtig diskutiert: Die Arbeitsgruppe um H. Lüllmann schlägt als Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung eine durch die Glykosid-Rezeptor-Bindung hervorgerufene ATPase-Konformationsänderung vor, die sekundär zur Konformationsänderung der Zellmembran und dadurch zur Loslösung

von intrazellulär an die Membran gebundenem Kalzium führt (193, 194, 251). In eine ähnliche Richtung zielen Vorschläge, wonach Herzglykoside allein durch allosterische Konformationsänderung des Rezeptorenzyms intrazellulär gebundene Ca^{2+} -Ionen freisetzen (23, 248). Auch eine Erhöhung des endogenen Katecholaminspiegels und damit ein β -adrenerger Wirkmechanismus werden für die Kontraktionskraftsteigerung unter Digitalis verantwortlich gemacht (143, 179). Einige Autoren halten darüberhinaus eine indirekte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern über den Zwischenschritt einer Konzentrationserhöhung von intrazellulärem Na^+ nach Hemmung des Transportenzyms durch Digitalis für denkbar (42, 55, 214).

Die gegenwärtig am meisten diskutierte Hypothese geht davon aus, daß Herzglykoside durch die spezifische Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration führen, der seinerseits durch Aktivierung eines $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Gegentauschsystems einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bewirkt (8, 157, 165, 184, 217, 224, 246, 294). Aufgrund der zahlreichen Hinweise für die Existenz eines wahrscheinlich energieunabhängigen, durch Na^+ -Ionen aktivierbaren und elektroneutral ($2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Ca}^{2+}$), möglicherweise auch $3 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Ca}^{2+}$ (274) arbeitenden $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Gegentauschsystems in der Zellmembran (16, 113, 122, 126, 179, 232, 279), verbindet dieses Modell den bekannten Befund der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Hemmung am zwanglosesten mit der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes.

Voraussetzung für die Erstellung eines kausalen Zusammenhanges zwischen intrazellulärer Na^+ - (und Ca^{2+}) Erhöhung und Herzwirksamkeit unter Digitalis war jedoch der experimentelle Nachweis, daß Herzglykoside beide Effekte auch parallel, d. h. im selben Konzentrationsbereich hervorrufen. Dieser Nachweis konnte von einer Reihe von Autoren an unterschiedlichen Versuchsmodellen erbracht werden (84, 113, 142, 182, 208, 245, 256). Dem wurde jedoch von anderen Untersuchern widersprochen, die keine Änderung der intrazellulären Kationenkonzentrationen oder der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität nach Gabe von deutlich positiv inotropen Dosen von Herzglykosiden fanden (38, 40, 87,

105, 211, 220, 234, 235). Sogar über eine - zumindest initiale - Stimulation des aktiven Kationentransportes durch niedrige Dosen von Herzglykosiden wurde mehrfach berichtet (51, 63, 111, 112, 118, 188, 216, 224) und daraus gefolgert, daß die Hemmung der Na^+ -Pumpe aus diesem Grund nicht der oder nicht der einzige für die Inotropie von Herzglykosiden verantwortliche Mechanismus sein könne (119, 134).

Bei all den genannten Untersuchungen muß jedoch der Einwand gelten, daß eine genaue Bestimmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität in intaktem Muskelgewebe aus meßtechnischen Gründen nicht unmittelbar, sondern erst nach entsprechender Aufbereitung des Versuchsmaterials möglich ist. Auch die direkte Messung der intrazellulären Elektrolytgehalte durch Einbringen von ionensensitiven Elektroden (182, 271) ist am isolierten Muskelpräparat immer mit einer Schädigung der zellulären Integrität verbunden. Eine Korrelation dieser Parameter mit gleichzeitig gemessenen inotropen Effekten nach Digitalisgabe erscheint daher problematisch (82, 214).

Das Problem wird dadurch weiter kompliziert, daß in einer Anzahl von in den letzten Jahren erschienenen Veröffentlichungen Hinweise für die Existenz von mindestens 2 Typen von g-Strophanthin-Bindungsstellen im Herzgewebe vorliegen (1, 80, 103, 118, 131, 145, 267, 280, 283, 289), während lange Zeit nur von einer Art von Bindungsstelle ausgegangen wurde (70, 80, 84, 203, 257, 273). Aufschlüsselung der vorhandenen Daten nach einzelnen Spezies führte zu der interessanten Hypothese, wonach digitalissensitive Lebewesen (Hund, Schaf, Katze, Mensch, Kalb etc.) 1 g-Strophanthin-Rezeptor besitzen, wohingegen eher digitalisunempfindliche Lebewesen (Ratte, Meerschweinchen) 2 Typen von Rezeptoren aufweisen (279). Unklar ist noch, ob den 2 Typen von Bindungsstellen auch zwei strukturell unterschiedliche Arten von $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Molekülen entsprechen (91, 196, 197, 266), ob zwei verschiedene Arten von g-Strophanthin-Rezeptoren (d. h. neben der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ein weiterer) mit unterschiedlichen Funktionen existieren, oder ob das ATPase-Molekül in zwei oder mehreren

Konformationen mit unterschiedlichen biochemischen und physiologischen Eigenschaften vorliegen kann (47, 71, 95, 144, 222, 280).

In jedem Fall jedoch wäre die Existenz eines Zwei-Rezeptoren-Systems in der Herzzelle von großem pharmakologischen Interesse, da damit eine Trennung von therapeutisch erwünschter, positiv inotroper Wirkung (1. Rezeptor) und nicht erwünschten, toxischen Effekten durch Hemmung der Na^+ -Pumpe (2. Rezeptor) erstmals auch theoretisch denkbar erscheint. Die Vorstellung einer unter diesen Umständen möglichen differenzierteren Therapie mit Digitalis muß jedoch Spekulation bleiben, solange die grundlegenden Fragen der Herzglykosid-Forschung (Zahl der Rezeptoren, Mechanismus der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung, Korrelation von Glykosidbindung und Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase) experimentell nicht eindeutig geklärt sind, sondern - wie oben gezeigt - kontrovers diskutiert werden.

Die experimentelle Bearbeitung einiger der angesprochenen Fragestellungen (s. a. 1.3.) wurde von uns an der Tierspezies Huhn durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial diente hierbei vor allem die intakte, kontrahierende Herzmuskelzelle in Kultur. Die Eigenschaften dieses Versuchsmodelles und einige Gründe, die seine Verwendung zum Studium der Pharmakodynamik von Herzglykosiden berechtigt erscheinen lassen, sollen daher kurz dargestellt werden.

1.2. Kontrahierende Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur - Ein geeignetes Untersuchungsobjekt der experi- mentellen Kardiologie?

Über Jahrzehnte hinweg basierte der Fortschritt in der experimentellen Kardiologie fast ausschließlich auf physiologischen, pharmakologischen und biochemischen Untersuchungen am intakten Tierherzpräparat (Langendorff-Präparat, Ventrikel/Vorhof/Papillarmuskelstreifen, Purkinje-Fasern) und an daraus gewonnenen Membranhomogenaten. Erst mit der Einführung von Techniken, die es erlaubten, Herzen oder andere Gewebe in ihre Zellbe-

standteile aufzutrennen (Überblick bei 64, 154, 240) und isolierte, spontan kontrahierende Muskelzellen über längere Zeiträume zu kultivieren (44), wurde es möglich, die bekannten Befunde nun auch an der isolierten Herzmuskelzelle auf ihre Gültigkeit zu überprüfen und einige Fragestellungen erstmals zu untersuchen.

In zahlreichen Arbeiten (Übersicht in 64, 65, 129, 187, 240) wurde dabei nachgewiesen, daß Herzmuskel-Zellkulturen ein geeignetes Untersuchungsobjekt zum Studium biochemischer, zellphysiologischer und pharmakologischer Fragestellungen der experimentellen Kardiologie darstellen, da sie - wie im folgenden gezeigt werden soll - gegenüber anderen Versuchsmodellen eine Reihe von Vorteilen aufweisen und bezüglich ihrer Eigenschaften gut charakterisiert sind.

1.2.1. Vorteile isolierter Herzmuskelzellen in Kultur als Versuchsobjekt der experimentellen Kardiologie

a) Fehlen neuraler oder autonom-humoraler Regulationsmechanismen:

Während in isolierten Herzmuskelpräparaten eine Vielzahl von neuronalen Strukturen intakt ist (53, 101) und dementsprechend auch Einflüsse von Neurotransmittern (z. B. Noradrenalin, Azetylcholin) als Folge indirekter Wirkungen des jeweils untersuchten Pharmakons nachgewiesen wurden (Überblick in 277), existieren in Myozytenkulturen keine intakten neuronalen Strukturen mehr (65). So konnte speziell für das embryonale Kükenherz belegt werden, daß sich hier eine adrenerge Innervation nicht vor dem zehnten Tag der Embryogenese entwickelt (204, 236), so daß auch Kulturen aus Herzgewebe in diesem embryonalen Alter kaum sympathische Elemente enthalten. Auch Speicher- oder Freisetzungsmechanismen für cholinerge oder adrenerge Neurotransmitter wurden nicht gefunden (257). Wenig wahrscheinlich ist darüberhinaus eine Beeinflussung von Untersuchungsergebnissen durch unkontrollierte Histaminfreisetzung auf Grund der sehr niedrigen Zahl von basophilen Granulozyten oder Monozyten in Herzmuskel-Zellkulturen (34, 123). Auch für

den Fall einer beschränkten Freisetzung von Transmittersubstanzen ist jedoch nicht anzunehmen, daß eine aktive Konzentration dieser Wirkstoffe im Medium von Zellkulturen erreicht wird (277).

Die Ausschaltung der erwähnten neuronalen und hormonalen Mechanismen ist gerade bei der Untersuchung der Digitaliswirkung von besonderer Wichtigkeit, da beispielsweise unkontrolliert freiwerdende Katecholamine die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (143, 183) und andere Neurotransmitter den Ca^{2+} -Fluß über die Membran (Überblick bei 233) beeinflussen und so auftretende Änderungen des Kontraktionsverhaltens nicht von einer direkten Herzglykosid-Wirkung unterschieden werden können.

b) Fehlen von interstitiellen Austauschräumen und Diffusionsbarrieren:

Herzmuskel-Zellkulturen in Monolayerform weisen in der Regel nur einen kleinen, gut kontrollierbaren (^{14}C -Inulin) interstitiellen Raum auf (ca. 5 %; 22), während dieser im intakten Herzgewebe zwischen 20-30 % des Gesamtvolumens ausmacht (23, 56). Dies hat den Vorteil, daß Pharmaka den Wirkort unmittelbar erreichen, Vorgänge wie Bindung von Wirkstoffen oder intrazelluläre Elektrolytverschiebungen sowie Enzymaktivitäten wegen der kleineren unspezifischen Effekte genauer gemessen werden können und auch schnell ablaufende Prozesse noch kinetisch erfaßbar sind. Darüberhinaus lassen sich Versuchsparameter (z. B. Temperatur, pH, Zusammensetzung der Testlösung etc.) rasch variieren und in ein neues Gleichgewicht bringen. Stoffwechselmetabolite diffundieren in Herzmuskel-Zellkulturen leichter ins umgebende Medium ab, als das bei den intakten Muskelpräparaten der Fall ist, und auch Störungen der O_2 -, Ionen- und Energiezufuhr, wie sie bei suboptimaler osmotischer und onkotischer Zusammensetzung der Perfusionslösung am Ganzherzpräparat durch Ödembildung vorkommen können (277), werden an Zellkulturen durch das Fehlen von Diffusionsbarrieren vermieden. Ebenso entfallen damit die z. T. beträchtlichen Probleme der ausreichenden Oxygenierung des Präparats (277).

c) Homogenität des Untersuchungsmaterials:

70 % der im Herzmuskel vorhandenen Zellen sind Bindegewebszellen (Endothel-, Epithelzellen, Fibroblasten), nur 30 % (die allerdings 75 % des Gesamtvolumens ausmachen) entfallen auf Myokardzellen (2, 127, 238). Da jedoch in der kardiologischen Forschung das Verhalten der Muskelzelle im Zentrum des Interesses steht, führt die Heterogenität der Zellzusammensetzung eines intakten Herzpräparates immer wieder zu Unsicherheiten bei der Interpretation von Untersuchungsergebnissen. Diese Unsicherheit ist berechtigt, wenn man an die deutlichen Unterschiede denkt, die zwischen Herzmuskelzellen und Herzbindegewebszellen bezüglich der elektrophysiologischen, funktionellen sowie strukturellen und biochemischen Eigenschaften bestehen (199). Gerade wenn man - wie gegenwärtig in der Diskussion über den Herzglykosid-Wirkungsmechanismus der Fall - von verschiedenen Formen der Herzglykosid-Rezeptoren und $(Na^{+} + K^{+})$ -ATPase-Moleküle im Herzen spricht, ist eine Überprüfung der am intakten Herzen bzw. an Zellmembran-Präparationen gewonnenen Ergebnisse an getrennten Kulturen von Muskelzellen und Bindegewebszellen von elementarer Bedeutung (290). Die Arbeit mit kultivierten Herzzellen erlaubt es, durch bestimmte Anreicherungsverfahren (26) nahezu "reine" Kulturen der einen oder anderen Gattung zu züchten und nach funktionellen (Kontraktilität), histochemischen sowie elektrophysiologischen, weniger zuverlässig nach elektronen- und lichtoptischen Gesichtspunkten zu differenzieren (199).

d) Unverletztheit des Präparats:

Außer den Untersuchungen der elektrischen Aktivität mit Hilfe der Mikroelektroden-Technik sind alle bekannten Methoden zur Messung funktioneller Parameter in Herzmuskel-Zellkulturen (Automatie, Inotropie, Ionenaustauschphänomene etc.) nicht invasiv (277). Es tritt hier keine Zerstörung der Zellintegrität durch mechanische Manipulation ein, wie dies vor allem bei der Arbeit mit Membranhomogenaten der Fall ist. Auch eine Alteration der Zellen durch die Bedingungen der Präparation (Trypsinierung, Zentrifugierung) scheint nur zu reversiblen,

funktionellen (205) und morphologischen (240, 265) Veränderungen zu führen. Speziell an Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur konnte keine andauernde Schädigung durch Trypsin festgestellt werden, da diese Zellen ihre hochspezifischen Membraneigenschaften (Ionenkanäle, Rezeptoren, elektrophysiologische Eigenschaften) auch nach Isolation behalten (206). Im Gegensatz zu Zellmembran-Homogenaten mit ihren aufgehobenen transmembranalen Ionengradienten stellen deshalb Kulturen intakter Zellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen von Ionen-transportphänomenen dar (85).

e) Fehlen von Blutgefäßen:

Da Herzmuskelzellen in Kultur via Diffusion ernährt werden, entfallen sämtliche Störfaktoren, wie sie durch das Vorhandensein einer intakten Blutgefäßversorgung im Ganzherzpräparat in vivo oder in vitro auftreten. Hierbei sind vor allem indirekte Veränderungen der Kontraktilität durch Pharmaka (z. B. Prostaglandine) auf Grund ihrer vasokonstriktiven (276) oder vasodilatativen (25) Wirkungen zu nennen, die dann nicht mehr von der direkten Wirkung dieser Pharmaka auf die Muskelzelle unterschieden werden können.

Die genannten Vorteile von kultivierten Herzzellen haben dazu geführt, daß dieses Versuchsmodell mittlerweile in größerem Umfang zu Forschungszwecken eingesetzt wird. Insgesamt sind an Zellkulturen bisher über 100 verschiedene Wirkstoffe getestet worden (240). Die aus dem Herzen des embryonalen (6-20 Tage in ovo) Hühnchens erhaltenen Muskelzellen zählen dabei zusammen mit Präparationen aus neonatalen Ratten (1 - 4 Tage alt) und embryonalen Mäusen (ca. 14. Tag) und gegenüber selten verwendeten Tierspezies wie Hamster, Meerschweinchen oder Kaninchen (Überblick bei 128) zu den am besten untersuchten Versuchssystemen (240), während menschliche embryonale oder adulte Herzmuskelzellen bislang wegen mangelhafter Kultivierungserfolge für wissenschaftliche Studien kaum eingesetzt wurden (Überblick bei 285).

1.2.2. Pharmakologische, biochemische und zellphysiologische Eigenschaften isolierter Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Von pharmakologischer Seite wurde der Einfluß einer Vielzahl von Wirkstoffen auf die Hühnermuskelzelle getestet: Katecholamine (Epinephrin, Isoproterenol, Norepinephrin, Isoprenalin; 89, 129, 139, 156, 181, 199, 206, 260, 293), β -Blocker (Dichlorisoproterenol, Prometholol, Propranolol; 89, 152, 293), Antiarrhythmika (Lidocain, Procain, Diphenylhydantoin, Quinidin; 151, 161, 207), Azetylcholin (89, 92, 139, 151, 260), Ca^{2+} -Antagonisten (D-600, Verapamil; 94, 164, 206, 256), Hormone (Insulin, Trijodthyronin; 250, 293), Herzglykoside (s. Diskussion), andere Substanzen (Überblick bei 240).

Für einige dieser Pharmaka sind auch eigene Rezeptoren beschrieben, so für Katecholamine (89, 185), Schilddrüsenhormone (250), Ca^{2+} -Antagonisten (198) und Herzglykoside (3, 157, 257). Daneben existiert eine Vielzahl von umfassenden elektrophysiologischen Studien gerade an der kultivierten Hühnerherz-Muskelzelle (148, 164, 205, 264), da sich aus noch unbekanntem Grund Experimente mit Mikroelektroden an Herzzellen anderer (Säugetier-) Spezies als schwieriger durchführbar erwiesen haben (240). Zellphysiologische und morphologische Untersuchungen lieferten darüberhinaus Erkenntnisse über transmembranale Ionenaustauschmechanismen für Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (39, 191, 205, 256, 274), Aminosäuretransportvorgänge (69), Zellmetabolismus (212), Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse (50), Kontraktionsverhalten (20, 24, 124, 156, 163) und pathophysiologische Phänomene (Hypoxie, Ischämie; 256).

Angesichts der hier zusammengefaßten Vielzahl von Veröffentlichungen und trotz mancher widersprüchlicher Befunde kann die Hühnerherz-Muskelzelle als gut untersuchtes und charakterisiertes Versuchssystem gelten. Um jedoch die Wertigkeit dieses Modells (und das gilt ganz allgemein für Zellkulturen) richtig einschätzen und die an ihm gewonnenen Ergebnisse richtig interpretieren zu können, ist die Beantwortung folgender Frage von großer Bedeutung:

1.2.3. Inwieweit lassen sich die an kultivierten, embryonalen Hühnerherz-Muskelzellen erhobenen Befunde auf intaktes, adultes Herzgewebe übertragen?

Die Prüfung dieser Frage erfordert eine Gegenüberstellung von Untersuchungen an intaktem, embryonalen Hühnerherz-Gewebe und embryonalen Hühnerherz-Muskelzellen unter morphologischen, funktionellen, elektrophysiologischen und pharmakologisch-biochemischen Gesichtspunkten.

Aufgrund von phasenkontrastmikroskopischen und elektronenoptischen Untersuchungen sowie durch Anwendung gezielter Färbetechniken konnte für das Huhn und andere Spezies nachgewiesen werden, daß die isolierte Herzmuskelzelle in Kultur phänotypisch unversehrt ist und sich morphologisch nicht von der Muskelzelle des intakten Herzens unterscheidet (64, 181, 199, 227). Ähnlich wie das intakte Präparat zeigt sie schon kurze Zeit nach Kultivierung autorhythmische Aktivität (Auftreten von Aktionspotentialen) mit Spontankontraktionen, was auf einen funktionsfähigen kontraktilem Apparat hinweist (54, 60, 263). Erste Untersuchungen der elektrischen Charakteristika der Zellmembran (Ruhemembranpotential, Aktionspotential, "overshoot") über intrazellulär applizierte Mikroelektroden (92) lieferten ähnliche Ergebnisse wie sie zuvor schon an unversehrten embryonalen Hühnerherzen beobachtet worden waren (36). Auch die Arbeitsgruppe um Mc Donald u. De Haan, die Zellrasen und Zellaggregate ("Cluster") von 7 - 8 Tage alten Hühnerembryonen mit intaktem Gewebe desselben Alters verglichen, erhielten übereinstimmende Daten für die Höhe des Ruhemembranpotentials, des "overshoot" und die intrazellulären Kationenkonzentrationen (205). Weitere Untersuchungen zeigten, daß Herzmuskel-Zellkulturen von 16 bzw. 13 Tage alten embryonalen Hühnerherzen die voll differenzierten elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen (199, 206), wie sie auch für den intakten embryonalen Hühnerventrikel beschrieben wurden. Auch die bekanntermaßen im intakten Myokard existierenden Ionenkanäle und Transportmechanismen sind in diesen Zellkulturen nachgewiesen worden (39, 126, 206, 265, 274).

Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß es während der normalen Embryonalentwicklung des Hühnerherzens zu einer ständigen Veränderung von Ionenflußphänomenen und elektrischen Eigenschaften kommt (264), in die durch die Vorgänge bei der Isolation eingegriffen wird. So besitzt beispielsweise das embryonale Hühnerherz am 2. - 4. Tag in ovo keine schnellen, Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven Na^+ -Kanäle (164); das Aktionspotential wird ausschließlich über den langsamen, TTX-insensitiven Na^+ -Einstrom erzeugt (mit der Folge eines niedrigen Ruhemembranpotentials). Erst ab dem 5. Tag der Embryonalentwicklung kommt es zum Auftreten von schnellen Na^+ -Kanälen, die ca. am 16. Tag ihr Aktivitätsmaximum erreichen (262). Explantiert man zu diesem Zeitpunkt Muskelzellen aus diesem Herzen, so ähneln die so gewonnenen Zellkulturen in ihren Eigenschaften jedoch wieder dem früheren Embryonalalter (2. - 4. Tag), d. h. die schnellen Na^+ -Kanäle sind inaktiv, wohingegen eine hohe Dichte von funktionellen, langsamen Na^+ -Kanälen nachweisbar ist (206, 265). Andere, ebenfalls stark vom embryonalen Entwicklungsalter abhängige Phänomene, wie die abnehmende Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten D-600 auf die Kontraktilität des Herzens oder der vom 2. - 14. Tag in ovo kontinuierlich abnehmende intrazelluläre K^+ -Gehalt, verlaufen dagegen im intakten Muskelpräparat und in der Zellkultur parallel (126, 205).

Von Interesse wäre hierbei auch der Vergleich von Herzmuskel-Zellkulturen des embryonalen und des adulten Herzens derselben Spezies bezüglich der genannten Parameter. Dies ist jedoch auf Grund der wenigen bisher erfolgreichen Versuche, spontan kontrahierende Kulturen aus dem adulten Myokard von Ratte, Kaninchen und Maus (keine Veröffentlichungen existieren für das Hühnchen) zu erhalten (27, 58, 93, 147, 210), zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich.

Es zeigt sich somit, daß das intakte embryonale Herz und die isolierte embryonale Herzzelle in Kultur aus elektrophysiologischer Sicht häufig identische Eigenschaften besitzen. In einzelnen Bereichen können jedoch auch deutliche Unterschiede festgestellt werden, weshalb Analogieschlüsse von einem Versuchsmodell auf das andere nicht problemlos sind. Dies gilt

ebenso für die Übertragung exakter, quantitativer pharmakologischer Befunde von einem Versuchsmodell auf das andere.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß Ca^{2+} -Ionen sowohl an isolierten Herzmuskelzellen als auch am Ventrikelstreifen des embryonalen Hühnerherzens die Kontraktionskraft steigern, daß jedoch der maximale Effekt bei sehr unterschiedlichen (3.6 mM für Muskelzellen; 10-11 mM für Ventrikelstreifen) Konzentrationen auftritt. Umgekehrt findet sich ein vergleichbarer negativ inotroper Effekt durch La^{3+} in Muskelzellen bereits in ca. 1000fach niedrigerer Konzentration als im intakten Präparat (20). Sinngemäß das gleiche gilt für das Katecholamin Noradrenalin, auf das beide Systeme in der für das Hormon gewohnten Weise ansprechen (z. B. Erhöhung der Kontraktionskraft und -frequenz), jedoch bei sehr unterschiedlichen Wirkkonzentrationen. Zellkulturen weisen hier gegenüber dem intakten Muskelpräparat eine deutlich größere Katecholaminempfindlichkeit auf (199). Dagegen führen Änderungen des extrazellulären K^{+} -Gehaltes und Applikation von 10^{-4}M g-Strophanthin zu einer identischen Verschiebung der intrazellulären Na^{+} - und K^{+} -Gehalte, d. h. in diesem Fall ist die Sensitivität in beiden Versuchssystemen gleich (205). Dem entspricht eine vergleichbare Empfindlichkeit der ATPase-Präparation aus Herzzellen und embryonalem Myokard gegenüber g-Strophanthin, wobei sich jedoch die spezifische Aktivität des Enzyms in beiden Präparationen um den Faktor 10 unterscheidet (261). Auch die Untersuchung anderer herzwirksamer Substanzen (β -Blocker, Hormone, Neurotransmitter) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Herzmuskelzelle erbrachte qualitativ dieselben Ergebnisse wie in intaktem, erwachsenen Myokardgewebe (139, 256) und bestätigte damit Studien an Herzmuskelzellen der adulten Ratte, wo gezeigt werden konnte, daß die metabolischen und hormonalen Kontrollmechanismen des intakten Herzmuskels durch den Prozeß der Isolation und Kultivierung nicht zerstört werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Hühnerherz-Muskelzelle in Kultur ein geeignetes Modell zum Studium von Pharmakawirkungen auf das Myokard darstellt, da sie bezüglich ihrer spezifischen morphologischen, elektrophysiologischen und

funktionellen Eigenschaften genau untersucht ist und darüber hinaus eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Versuchssystemen aufweist. Die an der Muskelzelle des embryonalen Hühnerherzens erhobenen Befunde können dabei - mit gewissen Einschränkungen - auf intaktes, adultes Herzgewebe übertragen werden (129, 256), sollten jedoch im Einzelfall durch vergleichende Untersuchungen an beiden Versuchssystemen überprüft werden (240).

Speziell für den Bereich der Digitalisforschung konnte gezeigt werden, daß die pharmakologischen Wirkungen dieser Substanzklasse sowohl in Herzmuskel-Zellkulturen als auch im menschlichen Myokard identisch sind und auf demselben Wirkmechanismus beruhen (Überblick bei 285). In diesem Zusammenhang wurden häufig kultivierte Muskelzellen des Hühnermyokards eingesetzt, um die Pharmakodynamik der Herzglykoside zu studieren (ausführliche Darstellung der hierzu vorliegenden experimentellen Befunde s. Kapitel 4). Sie haben sich dabei wiederholt als geeignetes Untersuchungsobjekt erwiesen (3, 24, 157, 159, 284, 286, 288, 290) und wurden daher auch bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Herzglykosid-Bindung und Herzglykosid-Wirkung als Versuchsmodell verwendet.

1.3. Zielsetzung und Fragestellung

Durch Identifizierung und genaue Charakterisierung der spezifischen Bindungsstellen für Herzglykoside in getrennten Kulturen von Herzmuskelzellen und Herzbindegewebszellen des embryonalen Hühnerherzens sollten insbesondere folgende Fragestellungen abgeklärt werden:

- 1) Gibt es einen oder mehrere eindeutig nachweisbare Arten von Rezeptoren für Herzglykoside im Herzen der Tierspezies Huhn?
- 2) Zeigen Herzglykosid-Rezeptoren in Hühnerherz-Muskelzellen und Hühnerherz-Bindegewebszellen unterschiedliche Bindungseigenschaften?
- 3) Wie korreliert die Besetzung des Glykosidrezeptors in Hühnerherzzellen mit der durch dieses Pharmakon hervorgerufenen Hemmung des aktiven transmembranalen Kationentransportes und seiner positiv inotropen Wirkung?
- 4) Lassen sich die bisher vor allem an Erythrozyten, Herzzellmembran-Präparationen und Muskelpräparaten gewonnenen Ergebnisse über die Glykosidbindung und Glykosidwirkung auch auf die intakte, kontrahierende Herzmuskelzelle übertragen oder gibt es Unterschiede?

2. METHODEN und MATERIALIEN

2.1. Untersuchungen an intakten Hühnerherzzellen in Kultur

Alle nachfolgenden an der intakten Zelle beschriebenen Experimente wurden an aus embryonalen Hühnerherzen gewonnenen Zellkulturen durchgeführt. Zwei Arten von Zellen wurden dabei verwendet:

- a) Hühnerherz-Muskelzellen
- b) Hühnerherz-Bindegewebszellen

Die Bezeichnung "Herzbindegewebszellen", die in dieser Arbeit im weiteren verwendet werden soll, entspricht dem im englischen Schrifttum gebräuchlichen Begriff "Heart non muscle cell" und bezieht sich auf kultivierte Herzzellen, die nicht mit Sarkomeren ausgestattet sind. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Fibroblasten und Endothelzellen (199). Sie besitzen im Gegensatz zur Herzmuskelzelle in Kultur eine hohe Proliferationskapazität (Überblick bei 31, 228).

2.1.1. Präparation und Kultivierung von Muskelzellen

Bei der Präparation wurde weitgehend nach dem von Harary u. Mit. ursprünglich für Rattenherzzellen entwickelten Verfahren vorgegangen (132):

Unter sterilen Bedingungen (Laminar flow) werden 50 - 200 bebrütete Hühnereier aufgeschlagen und die 10 - 12 Tage alten Hühnerembryonen entnommen. Nach Dekapitation werden die noch schlagenden Herzen freipräpariert und aus ihrem Situs entfernt. Die so gewonnenen Herzen werden in eiskalter (4 °C) PBSAG-Lösung (s. 2.3.) gesammelt und anschließend in kleine Stücke (Kantenlänge 1 mm) geschnitten. Um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen, ist eine weitere enzymatische Behandlung nötig ("Trypsinierung"). Sie erfolgt durch mehrmalige Zugabe eines Trypsin (0.12 %) - Kollagenase (0.03 %) - Gemisches (in PBSAG gelöst) bei einer Einwirkdauer von jeweils 15 min bei 37 °C.

Die bei den ersten 3 Trypsinierungsvorgängen gewonnenen Zellsuspensionen werden verworfen, da sie in erster Linie mesenchymale Zellen (26) und darüberhinaus einen relativ hohen Anteil an Zell-Débris und Erythrozyten enthalten. Die Überstände (jeweils etwa 15 - 20 ml) aller weiteren Trypsinierungsschritte werden abpipettiert und in Zentrifugenröhrchen gefüllt, in denen sich je 1 ml eiskaltes (4 °C) Wachstumsmedium befindet (s. 2.3.). Der Serumanteil des Wachstumsmediums stoppt die enzymatische Wirkung des Trypsins und damit die weitere Andauung der Zellen.

Die so gewonnenen Zellsuspensionen werden abzentrifugiert (für 10 min bei 300 x g), die Überstände verworfen und die Sedimente mit frischem Wachstumsmedium (37 °C) wieder in Suspension gebracht. Um nun die Herzmuskelzellen von den sich ebenfalls in der Suspension befindenden Bindegewebszellen zu trennen, bedient man sich des von Blondel u. Mit. (26, 154) beschriebenen Verfahrens der sog. "Differential Attachment Technique" (DAT), das auf einer unterschiedlichen Absetzgeschwindigkeit dieser beiden Zellarten in flüssigem Inkubationsmedium beruht. Dazu wird die noch heterogene Zellsuspension in mehrere, 75 cm² große Plastik-Kulturfläschchen (Nunclon Plastiks, DK-Roskilde, Dänemark) gefüllt und für etwa 2 Stunden in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C inkubiert (Heinicke-Napco-Brutschrank). In dieser Zeit sinkt der größte Teil der Bindegewebszellen auf den Grund der Kulturflasche ab und gewinnt dort festen Bodenkontakt. Die Myokardzellen, die noch frei in Suspension verblieben sind, können nun abpipettiert und in einem Becherglas gesammelt werden. Die Gesamtausbeute an Muskelzellen kann durch Auszählen mit Hilfe eines Hämocytometers unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt werden. Durch Zugabe von zusätzlichem Wachstumsmedium wird die jeweils gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Anschließend wird die so erhaltene Zellsuspension bei einer Einsaatdichte von ca. 10⁵ Zellen/cm² auf 25 cm² Plastik-Kulturfläschchen verteilt (Nunclon Plastiks, DK-Roskilde, Dänemark). Die weitere Inkubation der Zellkulturen erfolgt in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37 °C. Eine zusätzliche Begasung mit 5 % CO₂ ist nicht nötig, da das verwendete Wachstumsmedium CMRL-ATM-1415 bereits eine hohe Pufferkapazität aufweist

(136). Die Myokardzellen gewinnen allmählich Bodenkontakt und beginnen nach 12 - 24 Stunden mit rhythmischen Kontraktionen. Dies zeigt schon optisch, daß die bekanntermaßen durch mechanische und chemische Einflüsse der Präparation (z. B. Zentrifugation, Trypsinierung) an der Zelle hervorgerufenen Schäden (z. B. Auflösung der Sarkomerenstruktur) auch bei der Hühnermyokardzelle in kurzer Zeit reversibel sind (vgl. dazu 97, 153, 154, 200).

Nach 2 - 3 Tagen hat sich ein synchron schlagender Zellrasen gebildet. Alle experimentellen Studien wurden zu diesem Zeitpunkt durchgeführt.

2.1.2. Präparation und Kultivierung von Bindegewebszellen

Kulturen von Hühnerherz-Bindegewebszellen konnten ebenfalls nach der oben (2.1.1.) beschriebenen Methode gewonnen werden. Die Trennung von Muskel- und Bindegewebszellen erfolgte am Ende der "DAT-Zeit", also zu einem Zeitpunkt, an dem sich die Muskelzellen in Suspension befinden, während die Bindegewebszellen bereits Bodenkontakt gewonnen haben. Die Muskelsuspension wird entfernt und die Bindegewebszellen in Wachstumsmedium ohne Pferdeserum weitergezüchtet.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBSAG gespült und nachfolgend etwa 15 min in 0.02 % EDTA + 0.05 % Trypsin (in PBSAG gelöst) inkubiert (37 °C). In dieser Zeit lösen sich die Zellen vom Flaschenboden und können abzentrifugiert werden. Das Sediment wird in frischem Wachstumsmedium (ohne Pferdeserum) aufgespült und die Zellsuspension im Verhältnis von 1:2 auf neue Kulturfläschchen verteilt (sog. "Splitting"). Die experimentellen Untersuchungen wurden 2 - 3 Tage nach dem "Splitting" durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt bildeten die Bindegewebszellen einen lückenlosen Zellrasen.

2.1.3. Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung an Hühnerherzzellen

Alle Messungen wurden - soweit nicht anders bezeichnet - bei 37 °C mit Herzzellen in 25 cm² Plastik-Kulturfläschchen mit Hepes gepuffertem (20 mM, pH = 7.40) CMRL-1415-ATM-Medium durchgeführt. Dem CMRL-Medium wurden zusätzlich 2.5 % fötales Kälberserum und 2.5 % Pferdeserum zugesetzt. Der K⁺-Gehalt betrug 0.75 mM (Standard-Inkubationsmedium).

Vor jedem Experiment wurde das Züchtungsmedium abgesaugt und die Zellkulturen zweimal mit je 5 ml Waschtyrode (37 °C) und einmal mit 4 ml des Standard-Inkubationsmediums gespült. Das weitere Vorgehen war für die unterschiedlichen Untersuchungen verschieden und ist unter 2.1.3.1. - 2.1.3.2. beschrieben. Das jeweilige Experiment wurde gestoppt durch Absaugen des radioaktiv markierten Inkubationsmediums und nachfolgendes fünfmaliges Spülen mit je 5 ml eiskalter (4 °C) Stopp-Lösung (s. 2.3.). Die gewaschenen Zellrasen wurden anschließend in 1.3 ml Zell-Detergenz (0.1 M NaOH + 4.5 mM EDTA) aufgelöst. 700 µl davon wurden zur Radioaktivitätsmessung in ein Szintillationsröhrchen (Zinsser, D 6000 Frankfurt) pipettiert, mit 70 µl einer 1 M HCl neutralisiert und in 10 ml Unisolve (Zinsser) aufgeschwemmt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Berthold-Frieseke-Flüssigkeits-Szintillationszähler (Berthold-Frieseke, D 6000 München). 2 x 50 µl wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (192) verwendet. Dabei diente Rinderalbumin als Standard. 2 x 200 µl wurden für die flammenphotometrische Bestimmung der intrazellulären K⁺-Gehalte (s. 2.1.5.) entnommen.

Die experimentelle Durchführung und Auswertung der Versuche war bei Muskelzellen und Bindegewebszellen identisch. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Untersuchungen sowohl an Herzmuskelzellen als auch an Herzbindegewebszellen vorgenommen.

2.1.3.1. Zeitabhängige Bindung und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin

Bindung: Nach dem Spülen (s. 2.1.3.) wurden die Zellkulturen mit je 4 ml Standard-Inkubationsmedium für 240 min inkubiert. Anschließend wurde den Kulturfläschchen radioaktiv markiertes g-Strophanthin (^3H -g-Strophanthin, in H_2O gelöst) in einer bestimmten Menge zugesetzt (Endkonzentration pro Fläschchen $6 - 8 \times 10^{-8}\text{M}$) und der Bindungsvorgang zu verschiedenen Zeiten (15 sec - 720 min) gestoppt (s. 2.1.3.). Das bis dahin zellgebundene ^3H -g-Strophanthin konnte durch Radioaktivitätsmessung bestimmt werden (Einheit: cpm/mg Protein oder pmol/mg Protein). Zur Ermittlung des Wertes für die unspezifische Bindung (s. 2.1.3.3.) wurde bei einem Teil der Fläschchen die Bindung von ^3H -g-Strophanthin in Gegenwart von 10^{-4}M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin gemessen und ebenfalls zu verschiedenen Zeiten gestoppt. Die Subtraktion dieses Wertes von der Gesamtbindung ergab den Betrag der spezifischen Bindung von ^3H -g-Strophanthin.

Dissoziation: Nach einer Vorinkubationszeit von 240 min in Standard-Inkubationsmedium wurde den Fläschchen für weitere 120 min (Äquilibrium der ^3H -g-Strophanthin-Bindung; s. 3.1.1.) ^3H -g-Strophanthin ($6 - 8 \times 10^{-8}\text{M}$) bzw. dieselbe Menge ^3H -g-Strophanthin in Gegenwart von 10^{-4}M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin (unspezifische Bindung) zugesetzt. Danach wurden die Zellkulturen fünfmal mit Standard-Inkubationsmedium gewaschen und in strophanthinfreier Lösung weiter inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten (0 sec - 480 min) wurde die Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin durch fünfmaliges Spülen mit Stopp-Lösung beendet. Die Menge an ^3H -g-Strophanthin, die nach dem Auswaschen des bereits abdissoziierten Glykosids noch an die Zelle gebunden war, konnte nun durch Radioaktivitätszählung (s. 2.1.3.) bestimmt werden. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (bei 10^{-4}M g-Strophanthin) erhalten. Durch den Vergleich der maximal gebundenen ^3H -g-Strophanthin-Menge zur Dissoziationszeit $t = 0$ mit den weiteren Meßwerten für $t_{\text{Diss}} = 15 \text{ sec} - 480 \text{ min}$ konnte Ausmaß und Geschwindigkeit der Dissoziation des Glykosids von seiner Bindungsstelle erfaßt werden.

Die für die initiale Phase ($t = 15 - 180 \text{ sec}$) der Assoziations- und Dissoziationsreaktion erhaltenen Meßwerte wurden zur Berechnung der Assoziationsrate k_{+1} (s. 3.1.4.1.) und Dissoziationsrate k_{-1} (s. 3.1.4.2.) verwendet.

Die Temperaturabhängigkeit der g-Strophanthin-Bindung wurde ebenfalls gemäß diesem Versuchsaufbau bestimmt. Lediglich die Temperatur der Inkubationslösungen und Inkubationskammern mußte variiert werden ($9^\circ\text{C} - 36^\circ\text{C}$), wie dies in den Legenden der einzelnen Abbildungen angegeben ist. Zur Messung der Kaliumabhängigkeit (s. 3.1.5.) wurde die während der Assoziation und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin in den Kulturfläschchen befindliche Inkubationslösung in ihrem K^+ -Gehalt variiert ($0.75 - 3.5 - 5.4 - 20 \text{ mM}$). Die Vorinkubation (240 min in 0.75 mM K^+) war davon nicht betroffen.

2.1.3.2. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin

Nach dem Spülen wurden die Zellkulturen mit je 4 ml Standard-Inkubationsmedium für 240 min inkubiert. Dem Medium wurden von Anfang an eine bestimmte Menge an ^3H -g-Strophanthin und gleichzeitig steigende Mengen an nicht markiertem g-Strophanthin zugesetzt (Endkonzentration: $6 \times 10^{-8} - 10^{-2} \text{ M}$). Nach 240 min wurde die Bindung von ^3H -g-Strophanthin gestoppt und die zellgebundene Radioaktivität gemessen. Die erforderliche Inkubationszeit für das Äquilibrium der Bindung war zuvor durch eine zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an der intakten Hühnerherzzelle ermittelt worden (s. 3.1.1.).

2.1.3.3. Unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin

Bei jeder experimentellen Bestimmung der spezifischen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle muß auch der Anteil der unspezifischen Bindung berücksichtigt und quantitativ bestimmt werden. Unter unspezifisch gebundenem ^3H -g-Strophanthin faßt man diejenige Menge an ^3H -g-Strophanthin zusammen, die - obwohl nicht an eine spezifische Bindungsstelle gebunden - trotzdem nach dem Spülvorgang am Ende eines jeden Experiments in Form von meßbarer Radioaktivität in den

Kulturfläschchen verbleibt (z. B. auf Grund von Adhäsionen an Zellmembranen oder auch durch Verteilung von ^3H -g-Strophanthin im Extrazellulärraum). Um diesen Anteil für Hühnerherzzellen in Kultur zu bestimmen, ist es nötig, die spezifischen Herzglykosid-Bindungsstellen auf der Zellmembran abzusättigen (z. B. durch Überschuß an nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin) und anschließend die trotzdem "gebundene" Radioaktivität nach Zugabe von ^3H -g-Strophanthin zu messen. Durch hohe Konzentrationen an g-Strophanthin (10^{-2} - 10^{-4}M) wird eine spezifische Bindung von radioaktivem ^3H -g-Strophanthin in den von uns verwendeten Konzentrationen (ca. 10^{-6} - 10^{-8}M) vernachlässigbar, da die statistische Wahrscheinlichkeit für ein ^3H -g-Strophanthin-Molekül, an seine Bindungsstelle zu gelangen, in diesem Fall sehr gering ist.

Der Anteil dieser so gemessenen unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung ist konzentrationsabhängig und betrug in Hühnerherzzellen in Kultur zwischen 5 - 10 % bei 10^{-8}M und bis zu 50 % bei Verwendung von höheren g-Strophanthin-Konzentrationen im Inkubationsmedium (z. B. $3 \times 10^{-6}\text{M}$). Die Höhe der unspezifischen Bindung wurde in jedem Experiment neu bestimmt. Andere Verfahren, die spezifische Glykosidbindungsstelle zu blockieren (hohes K^+ ; s. 3.1.5.) oder zu zerstören (Hitzenaturierung; s. 3.1.2.), ergaben ebenfalls vergleichbare Werte für die Höhe der unspezifischen Bindung (vgl. auch 203). Um die spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die spezifische Herzglykosid-Bindungsstelle zu erhalten, muß die ermittelte unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert werden.

2.1.4. Messung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten in Hühnerherzzellen

Zur Charakterisierung und quantitativen Messung des transmembranalen K^+ -Transportes unter g-Strophanthin-Einfluß wurde aus meßtechnischen Gründen an Stelle von radioaktivem $^{42}\text{K}^+$ das Isotop $^{86}\text{Rb}^+$ verwendet (Tl/2 von $^{42}\text{K}^+$: 12.5 Stunden; Tl/2 von $^{86}\text{Rb}^+$: 18.7 Tage!). Dies ist zulässig, da sich Rubidium-Ionen bei den Transportprozessen über die Zellmembran ganz ähnlich

wie K^+ -Ionen verhalten (Überblick bei 22 und 295). Auch unter den oben beschriebenen Präparations- und Kultivierungsbedingungen konnte bereits an Rattenherz-Muskelzellkulturen experimentell bestätigt werden, daß eine Verwendung von $^{86}Rb^+$ als K^+ -Analogon gerechtfertigt ist (281). Zur Bestimmung der Aktivität der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase wurde daher in sämtlichen Experimenten an Zellkulturen der zelleinwärts gerichtete K^+ -Fluß über die $^{86}Rb^+$ -Aufnahme in die Zelle bestimmt und als nmol $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme pro mg Protein und Minute ausgedrückt. Diese im Schrifttum allgemein anerkannte und verwendete Einheit (160) ist unter Einbeziehung der jeweiligen extrazellulären K^+ -Konzentration berechnet und bietet gegenüber dem reinen Meßwert (cpm $^{86}Rb^+$) den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit von, unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Variation des extrazellulären K^+) erhaltenen, Versuchsergebnissen (281).

Zur Messung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahmeraten wurden die Zellkulturen nach den in 2.1.3. beschriebenen Spülvorgängen für 4 Stunden mit Standard-Inkubationsmedium in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von g-Strophanthin inkubiert. Anschließend wurde $^{86}Rb^+$ in Form von 50 μl $^{86}RbCl$ -Lösung zugegeben und der Aufnahme prozeß nach 10 min (bzw. nach 0.25 min) durch Absaugen des nunmehr radioaktiven Inkubationsmediums und fünfmaliges Spülen mit je 5 ml eiskalter (4 °C) Stopp-Lösung je Fläschchen beendet. Der gewaschene Zellrasen wurde identisch wie in 2.1.3. aufbereitet und den einzelnen Messungen (Proteinbestimmung, Radioaktivitätsmessung und flammenphotometrische Bestimmung des K^+ -Gehaltes) zugeführt. Die Messung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme über einen Zeitraum von 10 min wurde gewählt, weil in diesem Bereich die Aufnahme von $^{86}RbCl$ sowohl in Muskel- als auch in Bindegewebszellen eindeutig linear verläuft (Versuche nicht gezeigt), d. h. innerhalb von 10 min sind noch nicht so viele Rb^+ -Ionen ins Zellinnere transportiert worden, daß der passive oder aktive Rückstrom dieser Ionen die Aufnahmekinetik wesentlich verändern würde (erkenntlich an einem Abflachen der Kurve für die Aufnahmekinetik).

Unter der Voraussetzung der Linearität der Aufnahme über den gesamten Zeitraum der Messung läßt sich die Aufnahmerate von $^{86}\text{Rb}^+$ pro Minute daher aus der Differenz der gemessenen intrazellulären Aktivität von $^{86}\text{Rb}^+$ zum Zeitpunkt $t = 10 \text{ min}$ und $t = 0.25 \text{ min}$ dividiert durch die Zeit (9.75 min) errechnen. Diese Berechnung berücksichtigt bereits das Vorhandensein desjenigen Anteils an $^{86}\text{Rb}^+$, der zwar meßtechnisch bei der Radioaktivitätszählung miterfaßt wird, obwohl er niemals einem aktiven Transportprozeß in die Zelle unterworfen war (z. B. Adhäsion an der äußeren Seite der Zellmembran, Verteilung im Intrazellulärraum etc.) und damit das Meßergebnis verfälschen würde (sog. "unspezifische $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme").

Bei Kenntnis des Proteingehaltes der Versuchsfläschchen sowie der tatsächlich vorhandenen Menge an K^+ -Ionen im Medium können mittels der spezifischen Aktivität (eingesetzte Radioaktivität s. Legenden der einzelnen Abbildungen) die Influxraten von ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) in nmol/mg Protein x min errechnet werden.

2.1.5. Messung der zellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte

a) K^+ -Gehalte: Die intrazellulären K^+ -Gehalte wurden routinemäßig bei nahezu allen durchgeführten Experimenten gemessen. Hierzu wurde nach Beendigung des jeweiligen Experiments der Zellrasen durch Zugabe von Zelldetergenz (1.3 ml/25 cm² Fläschchen) suspendiert. Der Suspension wurden 2 x 200 µl (Doppelwerte) entnommen und in einem Szintillationsröhrchen (Zinsser) mit Wasser auf je 10 ml aufgefüllt. Mit Hilfe eines Flammenphotometers (Eppendorf Flammenphotometer) konnte der K^+ -Gehalt dieser Flüssigkeit bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsfaktoren und des Proteingehaltes pro Kulturfläschchen ließen sich aus den so gewonnenen Werten die intrazellulären K^+ -Gehalte in nmol/mg Protein errechnen.

b) Na^+ -Gehalte: Die intrazellulären Gehalte an austauschbarem Na^+ wurden durch Messung des zellulär gebundenen Tracers $^{22}\text{Na}^+$ unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt. Dazu wurden die Zellkulturen - wie unter 2.1.3. erläutert - mit Waschlösung und Standard-Inkubationsmedium gespült und anschließend mit

4 ml Standard-Inkubationsmedium (mit bzw. ohne g-Strophanthin) unter Zugabe des Tracers $^{22}\text{Na}^+$ ($^{22}\text{NaCl}$) für 4 Stunden inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts von Ein- und Ausstrom von $^{22}\text{Na}^+$ über die Zellmembran (282). Anschließend wurde der Transportvorgang gestoppt (s. 2.1.3.) und das Zellmaterial in der bereits beschriebenen Weise aufgearbeitet (s. 2.1.3.). Nach der Radioaktivitätszählung, die ein Maß für die unter Gleichgewichtsbedingungen im Zellinneren vorhandene Menge an $^{22}\text{Na}^+$ -Ionen darstellt, kann bei Kenntnis der im Inkubationsmedium vorhandenen Na^+ -Konzentration der intrazelluläre Na^+ -Gehalt über die spezifische Aktivität in nmol/mg Protein errechnet werden. Die Menge der in den einzelnen Versuchen in Form von $^{22}\text{NaCl}$ eingesetzten Radioaktivität ist in der Legende der betreffenden Abbildung aufgeführt.

2.1.6. Bestimmung der Anzahl von Herzglykosid-Bindungsstellen in Hühnerherzzellen

Um die Dichte der spezifischen Bindungsstellen für Herzglykoside in intakten Hühnerherzzellen zu ermitteln, wurden folgende Daten verwendet:

a) Maximale Bindungskapazität für ^3H -g-Strophanthin (B_{max}): 2.6 pmol/mg Protein (Muskel-Z.); 2.1 pmol/mg Protein (Bindegewebs-Z.). Die genannten Werte sind Mittelwerte aus allen zur konzentrationsabhängigen ^3H -g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführten Experimente (s. 3.1.3.; Tab. 2).

b) Verhältnis von Zellprotein/Zelle: Muskelzellen $0.55 \text{ mg}/10^6$ Zellen ($n=6$); Bindegewebszellen $0.24 \text{ mg}/10^6$ Zellen ($n=12$). Diese Werte ergaben sich durch Auszählung der angewachsenen Zellen pro Gesichtsfeld in der Zählkammer unter dem umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop (Leitz Diavert), anschließender Hochrechnung der Zellzahl auf die Gesamtfläche des Kulturfläschchens und Korrelation mit dessen Proteingehalt (ermittelt nach Lowry; 192).

c) Verhältnis von Zelloberfläche/Zelle: 2000 μm^2 /Zelle (Muskel-Z.); 1000 μm^2 /Zelle (Bindegewebs-Z.). Diese Daten wurden der Literatur entnommen (45, 203).

2.2. Untersuchungen an isolierten Zellmembranen aus embryonalen Hühnerherzen

Um die an der intakten Zelle gewonnenen Ergebnisse an einem weiteren Versuchsmodell überprüfen und mit den dort erhaltenen Daten vergleichen zu können, wurden Bindungsstudien und Messungen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität auch an Zellmembran-Präparationen von kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen durchgeführt.

2.2.1. Präparation der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ enthaltenden Zellmembranen

Die Methode der Präparation lehnt sich eng an die bereits von Erdmann u. Mit. beschriebene Technik (80) an. Sie soll für Hühnerherz-Zellmembranen im folgenden kurz zusammengefaßt werden:

Die Herzen von 300 Hühner-Embryonen (13 Tage alt, 12 g Feuchtwicht) werden in 60 ml einer 0.25 M Saccharose - 1 mM EDTA-Lösung bei einem pH von 7.25 homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 15 000 Upm für 30 min (Beckmann L5-50, Ti 60 Rotor) wird das Zentrifugat in 60 ml Saccharose-EDTA-Puffer suspendiert, NaJ (6 M, 15 ml) tropfenweise hinzugegeben und für 5 min bei 0 °C gerührt. Die Suspension wird anschließend bei 35 000 Upm für 30 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wird viermal durch Aufspülen in jeweils 200 ml EDTA-Lösung (1 mM, pH = 7.25) gewaschen und wiederum jeweils bei 35 000 Upm für 30 min zentrifugiert. Das jetzt noch verbliebene Zentrifugat wird nunmehr in 100 ml EDTA-Lösung (1 mM, pH = 7.25) suspendiert. Die Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität erfolgte im optisch-enzymatisch gekoppelten Test nach Schoner u. Mit. (242). Durch die Aktivität des so erhaltenen Enzyms wurden bei 37 °C 0.16 $\mu\text{Mole ATP pro min und mg Protein hydrolysiert}$. Etwa 75 % dieser Aktivität waren in Gegenwart von $10^{-3}\text{M g-Strophanthin}$

gehemmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry u. Mit. (192) mit Rinderalbumin als Standard.

2.2.2. Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität

Zur Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität unter dem Einfluß von g-Strophanthin wurden Hühnerherz-Zellmembranen bei 37 °C mit 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 2.8 nM ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-3}M) g-Strophanthin sowie 50 mM Imidazol/HCl-Lösung (pH=7.25) für 2 Stunden inkubiert (Reagenzglas im Schüttelwasserbad). Diese Zeit reicht bei den hier verwendeten Zellhomogenaten für die Einstellung eines Äquilibriums der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an das Enzymmolekül aus, d. h. nach zwei Stunden ist der gebundene Anteil an ^3H -g-Strophanthin maximal und steigt auch bei längerer Inkubation nicht weiter an (Experimente nicht gezeigt). Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurden der Enzymsuspension 0.4 ml entnommen und rasch bei 37 °C in den optisch-enzymatisch gekoppelten Test (242) eingebracht und die Reaktion mit Hilfe eines Extinktionsschreibers (Eppendorf-Kompensationsschreiber 6511) bei 334 nm kontinuierlich beobachtet. Die Gesamtaktivität an aktivierbarer ATPase wurde dabei durch Zugabe einer entsprechenden Menge H_2O an Stelle von g-Strophanthin und anschließender Messung der Aktivität im optisch-enzymatisch gekoppelten Test ermittelt. Der durch 10^{-3}M g-Strophanthin nicht hemmbare Anteil an der Gesamtaktivität stellt die unspezifische ATPase-Aktivität dar. Die Differenz beider Werte wurde als spezifische $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität bezeichnet.

2.2.3. Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung

Versuchsaufbau und Durchführung sind mit dem unter 2.2.2. beschriebenen Vorgehen identisch. Nach Ablauf der 2stündigen Inkubationszeit wurde der Enzymsuspension (2 ml) 1.6 ml entnommen und die ^3H -g-Strophanthin-Bindung an das Enzym mit Hilfe der "Schnellen Filtrationsmethode" (Glasfaserfilter Whatman GF/C) nach Erdmann u. Mit. (80) bestimmt. Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin wurde in Gegenwart von

10^{-3}M g-Strophanthin ermittelt. Die spezifische Bindung ergibt sich durch Subtraktion dieses Anteils von der gesamten gemessenen Bindung. Die Assoziations- und Dissoziationsraten (k_{+1} und k_{-1}) der ^3H -g-Strophanthin-Bindung an das Enzym wurden nach Erdmann u. Mit. (70) ermittelt. Bezüglich der theoretischen Grundlagen sei auf das Kapitel 3.1.4. verwiesen.

2.3. Inkubationslösungen

a) Wachstums (Züchtungs-) Medium:

CMRL-1415-ATM-Medium (Fa. Biochrom, D 1000 Berlin) gemäß (136), ergänzt durch 10 % Pferdeserum, 10 % fötales Kälberserum und 0.05 mg/ml Gentamycin, pH = 7.40 (eingestellt mit NaOH). Die Züchtung von Bindegewebszellen wurde ohne Zugabe von 10 % Pferdeserum vorgenommen.

b) Standard-Inkubationsmedium:

CMRL-1415-ATM-Medium gemäß (136), ergänzt durch 2.5 % Pferdeserum und 2.5 % fötales Kälberserum, gepuffert mit 20 mM Hepes, pH = 7.40 (eingestellt mit NaOH), K^+ -Gehalt 0.75 mM (wenn nicht anders angegeben).

c) Wasch (Spül-) Lösung:

Hepes-Buffered-Salt-Solution mit folgender Zusammensetzung: NaCl 135 mM; KCl 0.75 mM; CaCl_2 1.8 mM; MgCl_2 1.05 mM; NaH_2PO_4 0.36 mM; D-Glukose 5 mM; Hepes 20 mM; pH = 7.40 (eingestellt mit NaOH).

d) Stopp-Lösung:

Calcium-Sorbitol-Lösung mit folgender Zusammensetzung: CaCl_2 1.8 mM; Sorbit 280 mM; pH = 7.40 (eingestellt mit NaOH).

e) PBSAG:

Phosphate-Buffered-Saline A + Glukose; PBSAG stellt eine von Harary u. Mit. (132) beschriebene, Ca^{2+} - und Mg^{2+} freie Salzlösung mit folgender Zusammensetzung dar: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.6 mM, KH_2PO_4 2.1 mM; pH = 7.40. Da noch D-Glukose (5 mM) zugegeben wurde, wird die Bezeichnung PBSAG verwendet.

f) Zell-Detergenz:

0.1 M NaOH + 4.5 mM EDTA

2.4. Materialien

Die verwendeten Chemikalien und radioaktiv markierten Verbindungen wurden von folgenden Firmen bezogen: Biochrom, D 1000 Berlin: Collagenase "Worthington" 125-250 U/mg, CLS II; Fötalles Kälberserum Nr. 50103; Pferdeserum Nr. 50113; CMRL-1415-ATM-Medium; Serva Biochemica, D 6900 Heidelberg: Trypsin 1:250 Nr. 37920; Rinder-Albumin Nr. 11920; Hepes Nr. 25235; Sorbit Nr. 35230; NEN-Chemicals, D 6072 Dreieich: $^{22}\text{NaCl}$ -trägerfrei; $^{86}\text{RbCl}$ 0.9-4.6 mCi/mg, $^3\text{H-g-Strophanthin}$ 14-20 Ci/mmol; Byk-Essex, D 8000 München: Gentamycin (Sulmycin^R).

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, D 6100 Darmstadt; Böhringer-Mannheim, D 6800 Mannheim; Serva Biochemica, D 6900 Heidelberg.

3. ERGEBNISSE

3.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzzellen in Kultur und an isolierte Zellmembranen des embryonalen Hühnerherzens

3.1.1. Zeitabhängige Bindung und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin

Zur Messung der zellulären Bindung von ^3H -g-Strophanthin wurden Herzmuskelzellen mit $6.1 \times 10^{-8}\text{M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37°C inkubiert. Das zellgebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten (15 sec - 120 min) bestimmt und die erhaltenen Werte (cpm/mg Protein) gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 1; Assoziation). Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin ($\blacktriangle$ - $\blacktriangle$) beträgt dabei weniger als 10 % der Gesamtbindung ($\bullet$ - $\bullet$) und wurde in Gegenwart von 10^{-4}M , nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin unter sonst identischen Versuchsbedingungen bestimmt (s. a. 2.1.3.3.). Ihr Betrag steigt auch nach 30 min noch langsam aber kontinuierlich an. Die geringe Zunahme der Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin nach 30 min entspricht genau dem Anstieg der unspezifischen Bindung, so daß sich für die spezifische Bindung in Hühnermuskelzellen ($\square$ - $\square$) eine innerhalb von 30 min sättigbare Bindungskinetik ergibt. Dieses Gleichgewicht ist hier über 120 min und in anderen Experimenten (nicht gezeigt) über mindestens 8 Stunden stabil. Untersuchungen an Herzbindegewebszellen liefern ein ganz ähnliches Bild: Die Assoziationsreaktion von g-Strophanthin an seine Bindungsstelle befindet sich spätestens nach 120 min im Gleichgewicht mit der Dissoziationsreaktion. Auch nach weiteren 240 min Inkubation mit ^3H -g-Strophanthin ist kein nennenswerter Anstieg der spezifischen Bindung mehr zu beobachten (Abb. 2).

Zur Messung der Dissoziationsreaktion wurden Herzmuskel-Zellkulturen 120 min mit $6.1 \times 10^{-8}\text{M}$ ^3H -g-Strophanthin inkubiert, anschließend das radioaktiv markierte Medium abgesaugt und der Dissoziationsvorgang über 30 min in strophanthinfreier Lösung verfolgt (Abb. 1; Dissoziation). Es zeigt sich, daß der größte Teil des ursprünglich gebundenen, radioaktiv markierten ^3H -g-Strophanthins ($t_{\text{diss}} = 0$) innerhalb von 5 min in das umlie-

gende Medium abgegeben wird. Nach 10 min sind mehr als 90 % der vorher gebundenen ^3H -g-Strophanthin-Moleküle dissoziiert.

Daß die g-Strophanthin-Bindung reversibel und sowohl Dissoziation als auch Assoziation rasch verlaufende Vorgänge sind, wird auch durch folgendes Experiment (nicht gezeigt) belegt: Hühnerherz-Muskelzellen wurden für 120 min mit $3.4 \times 10^{-8}\text{M}$ ^3H -g-Strophanthin inkubiert und anschließend die spezifische Bindung zu 560 ± 10 fmol/mg Protein ($n=3$) bestimmt (Kontrollwert). In parallel dazu durchgeführten Experimenten wurde bei sonst gleichen Bedingungen nicht markiertes g-Strophanthin in einer Endkonzentration von ebenfalls $3.4 \times 10^{-8}\text{M}$ zugegeben, der Zellrasen nach 120 min mit glykosidfreier Lösung gespült und danach die Zellen für weitere 60 min mit $3.4 \times 10^{-8}\text{M}$ ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Beendigung dieser Inkubationszeit wurde für die spezifische Bindung ein Wert von 520 ± 60 fmol/ mg Protein ermittelt. Dies entspricht 93 % des Kontrollwertes. Daraus ergibt sich, daß innerhalb von 60 min fast das gesamte gebundene, nicht radioaktiv markierte g-Strophanthin von seiner Bindungsstelle dissoziiert ist und durch ^3H -g-Strophanthin ersetzt werden konnte.

3.1.2. Einfluß der Hitzedenaturierung auf die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle

Hühnerherz-Muskelzellen wurden für 60 min bei 37 °C (Kontrolle) bzw. 60 °C (hitzedenaturierte Zellen) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von ^3H -g-Strophanthin in einer Endkonzentration von $9 \times 10^{-8}\text{M}$ und nach weiteren 240 min die Bestimmung der zu diesem Zeitpunkt zellgebundenen Radioaktivität (in beiden Gruppen bei 37 °C). Die unspezifische Bindung wurde sowohl für den Kontrollwert als auch für hitzedenaturierte Zellen in Gegenwart von 10^{-3}M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Demnach führt Proteindenaturierung bei Hühnerherz-Muskelzellen zu einer Verminderung der maximalen ^3H -g-Strophanthin-Bindung auf 7 %

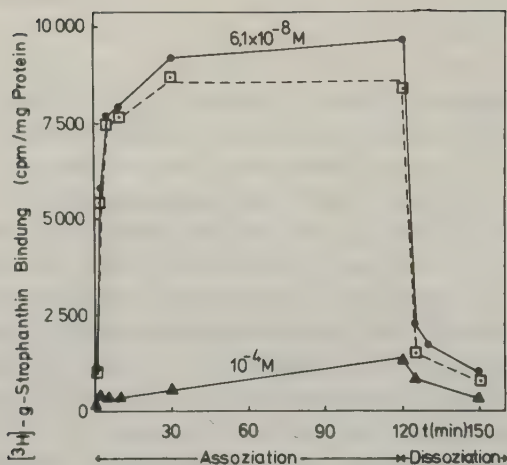


Abbildung 1: Kinetik der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen

Die Untersuchungen wurden an Hühnerherz-Muskelzellen bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium bei $[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$ durchgeführt. Nach Vorinkubation der Kulturen für 240 min wurde dem Inkubationsmedium ^3H -g-Strophanthin ($3.3 \times 10^6 \text{ cpm/Fläschchen}$) zugegeben. Die Endkonzentration an g-Strophanthin wurde auf $6.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (●—●) bzw. 10^{-4} M (▲—▲) eingestellt. Der Proteingehalt pro Fläschchen betrug 0.65 mg, das Inkubationsvolumen war 4.1 ml, Aussaatdichte : 100 000 Zellen/cm².

Assoziation:

Zu den angegebenen Zeiten wurde das nicht zellgebundene ^3H -g-Strophanthin ausgewaschen und die verbliebene, zellgebundene Radioaktivität bestimmt.

Dissoziation:

Nach Vorinkubation (240 min) wurde den Fläschchen für weitere 120 min ^3H -g-Strophanthin zugegeben ($3.3 \times 10^6 \text{ cpm/Fläschchen}$; Endkonzentration: $6.1 \times 10^{-8} \text{ M}$, ●—●; 10^{-4} M , ▲—▲). Anschließend wurden die Zellrasen fünfmal bei 37 °C mit Inkubationsmedium ohne g-Strophanthin gewaschen und in strophanthinfreiem Medium weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde dann das zellgebundene ^3H -g-Strophanthin bestimmt. Zur Berechnung der spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung ($\square-\square$) wurde die zellgebundene Radioaktivität in Gegenwart von 10^{-4} M g-Strophanthin von der zellgebundenen Radioaktivität in Gegenwart von $6.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ abgezogen.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Dreifachwerte.

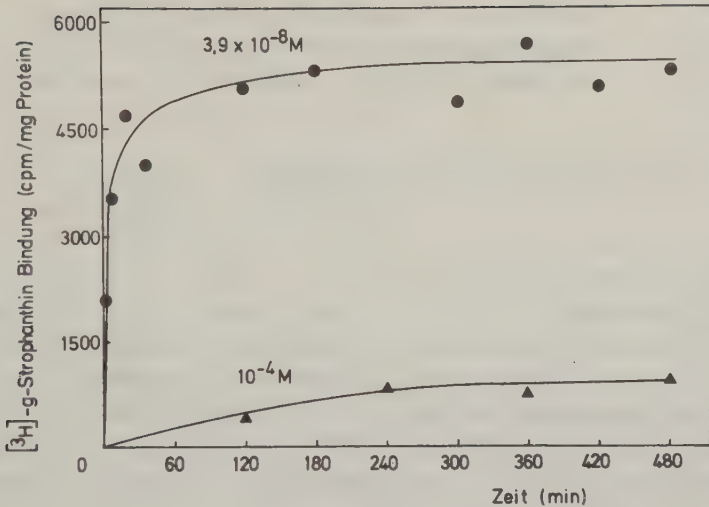


Abbildung 2: Kinetik der 3H -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühnerherz-Bindegewebszellen

Die Untersuchungen wurden bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($[K^+]$ = 0.75 mM) durchgeführt. Nach einer Vorinkubation der Kulturen für 60 min wurde dem Medium 3H -g-Strophanthin zugegeben, der Bindungsvorgang zu den angegebenen Zeiten gestoppt und das zellgebundene 3H -g-Strophanthin bestimmt (●—●). Bei Inkubationszeiten mit 3H -g-Strophanthin von > 60 min (120 - 480 min) wurde auf eine Vorinkubation verzichtet und sofort das radioaktiv markierte Glykosid zugegeben. Die eingesetzte Radioaktivität betrug 2.9×10^6 cpm/Kulturfläschchen, was einer Endkonzentration von $3.9 \times 10^{-8} M$ g-Strophanthin entsprach. Zur Berechnung der spezifischen 3H -g-Strophanthin-Bindung wurde gleichzeitig auch die zellgebundene Radioaktivität in Gegenwart von $10^{-4} M$ g-Strophanthin bestimmt und aufgetragen (▲—▲). Der Proteingehalt pro Kulturfläschchen betrug 0.61 mg, das Gesamtkubationsvolumen war 4.1 ml.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

Tabelle 1: Einfluß von Hitzedenaturierung auf die ^3H -g-Strophanthin-Bindung und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

	KONTROLLE	HITZE- DENATURIERUNG
<u>^3H-g-Strophanthin-Bindung</u>		
(cpm / mg Protein)		
$9 \times 10^{-8}\text{M}$ g-Strophanthin	31 850 $\pm$ 457	2 279 $\pm$ 76
10^{-3}M g-Strophanthin	1 507 $\pm$ 49	2 152 $\pm$ 72
<u>($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate</u>		
(nmol / mg Protein $\times$ min)	23.9 $\pm$ 1.2	0.1
<u>Zellprotein</u>		
(mg / Fläschchen)	1.93	1.78

Hühnerherz-Muskelzellen (Aussaatdichte: 160 000/cm²) wurden für 60 min in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium (pH = 7.40) bei einer Temperatur von 37 °C (Kontrolle) bzw. 60 °C (Hitzedenaturierung) inkubiert.

^3H -g-Strophanthin-Bindung: Anschließend wurden dem Inkubationsmedium ^3H -g-Strophanthin (4.5×10^6 cpm/Fläschchen) und g-Strophanthin in einer Endkonzentration von $9 \times 10^{-8}\text{M}$ bzw. 10^{-3}M zugegeben. Nach weiteren 240 min Inkubation bei 37 °C wurde dann das zellgebundene ^3H -g-Strophanthin durch Radioaktivitätszählung bestimmt.

($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate: Nach der 60minütigen Vorinkubation bei 37 °C und 60 °C wurden die Zellkulturen für weitere 240 min bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dem Medium $^{86}\text{RbCl}$ -Lösung (2.8×10^6 cpm/Fläschchen) zugegeben und die Aufnahme über einen Zeitraum von 10 min ermittelt (s. METHODEN).

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD (n = 3).

des Ausgangswertes. Der Wert von 7 % sinkt auch in Gegenwart von 10^{-3}M g-Strophanthin nicht weiter ab und ist annähernd identisch mit der unter Kontrollbedingungen (37°C) ermittelten unspezifischen Bindung (5 %).

3.1.3. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin: Scatchard Plot

Im Experiment der Abb. 3 a wurde die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an kultivierte Herzzellen in Abhängigkeit von der Glykosidkonzentration unter Gleichgewichtsbedingungen (s. 3.1.1.) bestimmt. Als unspezifisch wurde die Bindung von ^3H -g-Strophanthin in Gegenwart von 10^{-4}M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin von der Gesamtbindung abgezogen und dadurch der Anteil der spezifischen Glykosidbindung erhalten (s. 2.1.3.3.).

Man erkennt, daß die spezifische, konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle sowohl in Hühnerherz-Muskelzellen als auch in Hühnerherz-Bindegewebszellen einem Maximum zustrebt. Eine Erhöhung der Glykosidkonzentration von 10^{-6}M auf 10^{-5}M führt zu keiner meßbaren Zunahme der Glykosidbindung in diesen Zellen. Eine Auftragung der Meßdaten nach Scatchard (239) ergibt für beide Zellarten eine Gerade ($r=-0.98$; Abb. 3 b). Man erkennt, daß sich das g-Strophanthin-Bindungsverhalten von Muskel- und Bindegewebszellen nur in ihrer maximalen Bindungskapazität für g-Strophanthin unterscheidet (Höhe des Schnittpunktes der Geraden mit der Ordinate; Einheit: pmol/mg Protein). Die Affinität ihrer jeweiligen Bindungsstellen zum g-Strophanthin-Molekül dagegen ist gleich groß, da sich für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D , errechnet aus den Steigungen der beiden Geraden, mit $2.2 \times 10^{-7}\text{M}$ (Muskelzellen) und $2.3 \times 10^{-7}\text{M}$ (Bindegewebszellen) annähernd der gleiche Wert ergibt.

Um die an der intakten Zelle erhobenen Daten mit unter anderen experimentellen Bedingungen gewonnenen Ergebnissen an derselben Tierspezies vergleichen zu können, wurden die Bindungsstudien auch an isolierten Zellmembranen von kultivierten Hühner-

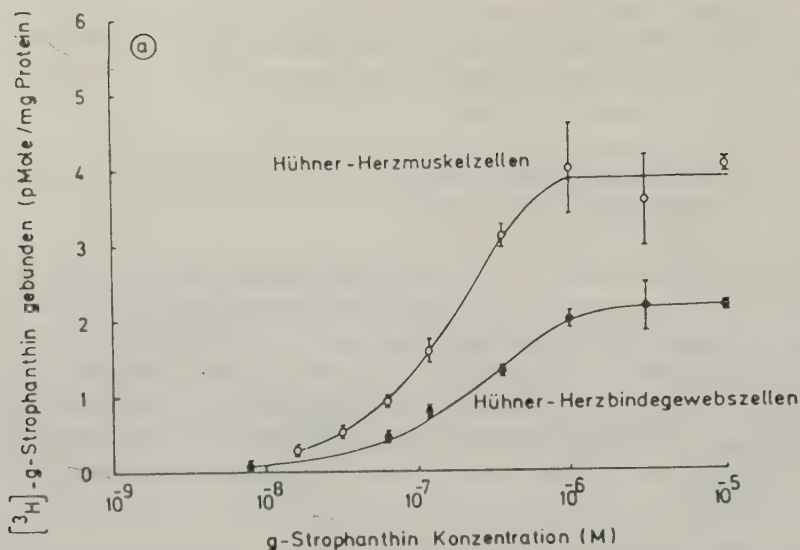


Abbildung 3: Konzentrationsabhängigkeit der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühnerherzzellen

Abb. 3 a: Hühnerherzzellen wurden für 240 min bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$) in Gegenwart von ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin inkubiert.

Muskelzellen:

Inkubationsvolumen: 4.1 ml/Fläschchen

Aussaatdichte: 100 000 Zellen/cm²;

Zellprotein/Fläschchen: 0.91 mg

eingesetzte Radioaktivität:

$0.9 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=}$ $1.6 \times 10^{-8} \text{ M}$ g Strophanthin),

$1.8 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=}$ $3.1 \times 10^{-8} \text{ M}$),

$3.7 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=}$ $6.2 \times 10^{-8} \text{ M}$) für alle weiteren Meßwerte.

Bindegewebszellen:

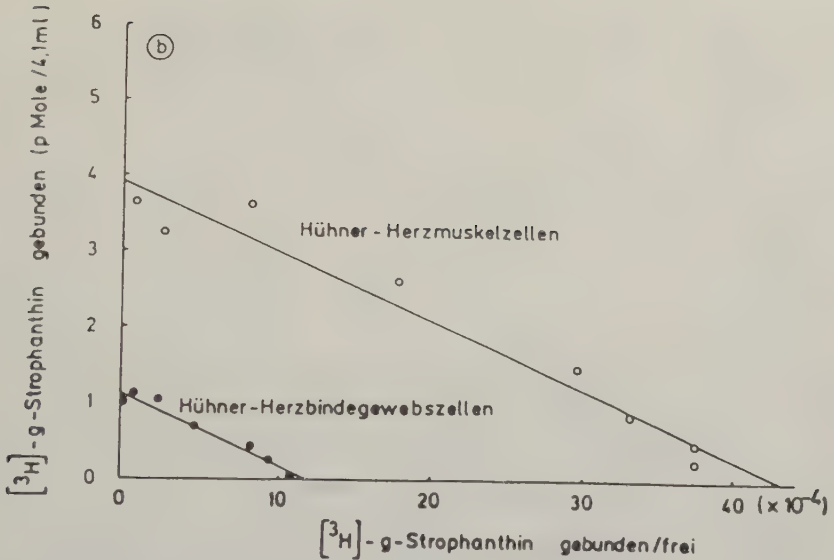
Inkubationsvolumen: 4.1 ml/Fläschchen

Zellprotein/Fläschchen: 0.52 mg

eingesetzte Radioaktivität:

$0.4 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=}$ $7.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ g-Strophanthin),

$3.2 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=}$ $6.2 \times 10^{-8} \text{ M}$) für alle weiteren Meßwerte.



Zur Ermittlung der spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurde die in Gegenwart von 10^{-2}M g-Strophanthin gemessene unspezifische Bindung (7 - 9 % der maximal gebundenen Radioaktivität) von der Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin abgezogen.

Abb. 3 b: Die Bindungsdaten aus Abb. 3 a sind hier nach Scatchard (239) aufgetragen. Die lineare Regression ergibt folgende Ergebnisse:

Muskelzellen:

$$\begin{aligned} B_{\max} &= 4.3 \text{ pmol/mg Protein} \\ K_D &= 2.2 \times 10^{-7} \text{ M} \\ r &= -0.98 \end{aligned}$$

Bindegewebszellen:

$$\begin{aligned} B_{\max} &= 2.2 \text{ pmol/mg Protein,} \\ K_D &= 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M} \\ r &= -0.98 \end{aligned}$$

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD (n = 3).

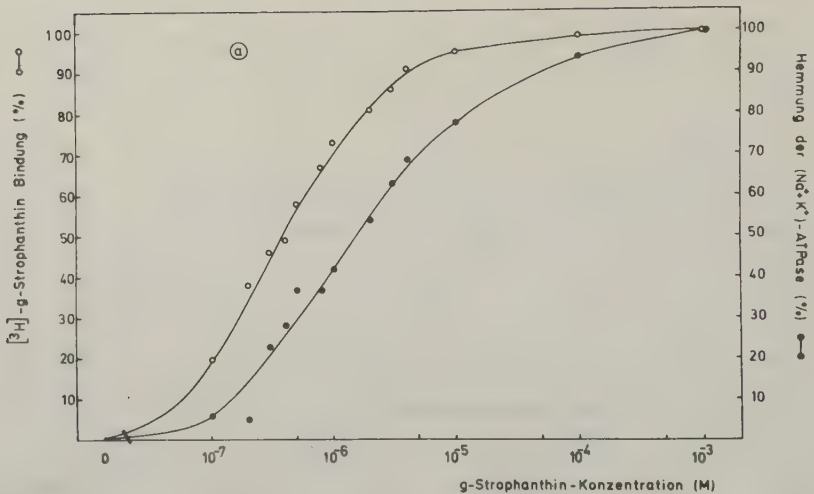


Abbildung 4: Spezifische, konzentrationsabhängige Bindung von ³H-g-Strophanthin an die (Na⁺ + K⁺)-ATPase und strophanthininduzierte Hemmung der (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität in Zellmembranen von embryonalen Hühnerherzen

Hühnerherz-Zellmembranen (0.24 mg Protein, (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität = 0.16 μ mol hydrolysiertes ATP/min x mg Protein bei 37 °C) wurden bei 37 °C mit 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 2.8 nM ³H-g-Strophanthin und steigenden Mengen an nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin (10⁻⁷ M - 10⁻³ M) in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer (pH = 7.25, Gesamtvolumen 2.0 ml) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 120 min (Äquilibrium der ³H-g-Strophanthin-Bindung; Versuche nicht gezeigt) wurden 0.4 ml dieses Inkubationsgemisches zur Bestimmung der (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität (s. METHODEN) entnommen, die verbleibenden 1.6 ml wurden zur Ermittlung der ³H-g-Strophanthin-Bindung mittels Filtration (s. METHODEN) verwendet. Die in Gegenwart von 10⁻³ M g-Strophanthin gemessene (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität bzw. ³H-g-Strophanthin-Bindung wurde als nicht-spezifisch von der Gesamtaktivität bzw. Gesamtbindung abgezogen.

Abb. 4 a:

Die (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität (●-●) wurde durch eine g-Strophanthin-Konzentration von 1.4×10^{-6} M um 50 % gehemmt, während 50 % der Glykosidbindungsstellen bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 3.6×10^{-7} M besetzt sind (O-O).

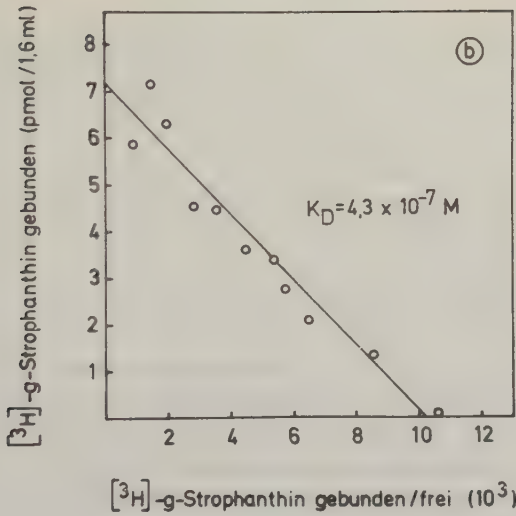


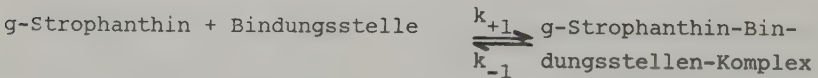
Abb. 4 b:

Auftragung der Bindungsdaten aus Abb 4 a nach Scatchard (239). Unter der Annahme einer einheitlichen Klasse von Bindungsstellen für g-Strophanthin, errechnet sich die Dissoziationskonstante K_D von $4.3 \times 10^{-7} \text{ M}$.

herz-Muskelzellen durchgeführt: Zur Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurden die Zellmembranen mit ^3H -g-Strophanthin ($2.8 \times 10^{-9}\text{M}$) und steigenden Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin ($10^{-7}\text{M} - 10^{-3}\text{M}$) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 120 min (Gleichgewicht der Bindung; Versuche nicht gezeigt) wurde das membrangebundene ^3H -g-Strophanthin mittels der "Schnellen Filtrationsmethode" (s. 2.2.3.) bestimmt. Abb. 4 a zeigt, daß auch in Zellmembranen die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle ein sättigbarer, einem Bindungsmaximum zustrebender Prozeß ist. Die Dissoziationskonstante dieser Reaktion kann ebenfalls nach Umrechnung der Meßdaten gemäß Scatchard aus der Steigung der Geraden in Abb. 4 b ermittelt werden. Sie beträgt in dem gezeigten Experiment $4.3 \times 10^{-7}\text{M}$ und stimmt dabei sehr gut mit den an der intakten Hühnerzelle gewonnenen Werten überein (s. Tab. 2).

3.1.4. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung

Die Reaktion von g-Strophanthin mit seiner Bindungsstelle ist ein reversibler Vorgang (s. 3.1.1.). Wenn - wie unter 3.1.4.1. und 3.1.4.2. noch gezeigt werden soll - diese Reaktion dem Massenwirkungsgesetz folgt, so gilt folgende Beziehung:



Die Assoziationsrate k_{+1} ist dabei proportional der Zahl an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen, die sich aus einer vorgegebenen Menge an g-Strophanthin und Bindungsstellen pro Zeiteinheit bilden. Umgekehrt ist die Dissoziationsrate k_{-1} ein Maß dafür, wieviele der Glykosid-Bindungsstellen-Komplexe pro Zeiteinheit in ihre Bestandteile zerfallen. Die beiden Geschwindigkeitskonstanten lassen sich experimentell durch getrennte Messung der Hin- und Rückreaktion bestimmen.

Nach Ermittlung von k_{+1} und k_{-1} ist es möglich, die Dissoziationskonstante K_D der g-Strophanthin-Bindung zu berechnen

(Quotient aus k_{-1} und k_{+1}). Auch eine weitere Charakterisierung der thermodynamischen Eigenschaften der g-Strophanthin-Bindung ist bei Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten möglich (s. 3.1.4.3.).

3.1.4.1. Bestimmung der Assoziationsrate k_{+1}

Nach 4stündiger Vorinkubation der Zellkulturen in Standard-Inkubationsmedium (s. METHODEN) bei 37 °C wurde dem Medium ^3H -g-Strophanthin in einer Endkonzentration von $6.2 \times 10^{-8}\text{M}$ zugesetzt. Zu verschiedenen Zeiten (15 sec - 180 sec) wurde die bis dahin zellgebundene Radioaktivität bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 5 a). Im selben Experiment wurde die maximal vorhandene Zahl an Bindungsstellen (B_{max}) pro mg Protein mittels einer konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin (s. 3.1.3.) bestimmt.

Der Assoziationsprozeß von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle ist mit einer bimolekularen Reaktion vereinbar: Nach Einsetzen der Meßwerte für die Glykosidbindung in eine Gleichung für eine Reaktionskinetik 2. Ordnung

$$k_{+1} = \frac{2.303}{(a+b)} + \log \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (bekannt)

b = Anfangskonzentration an freiem Rezeptor = B_{max} (bekannt)

x = Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen zur Zeit t (gemessen)

t = Reaktionszeit

und Auftragen gegen die Reaktionszeit ergibt sich eine lineare Beziehung (Abb. 5 c). Aus der Kurve in Abb. 5 c errechnet sich eine Assoziationsrate der g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Muskelzellen von $1.5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. Für Bindegewebszellen wurde ein Wert von $(2.2 \pm 1.6 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1})$ ermittelt (Versuche nicht gezeigt; s. Tab. 3) Die für die Assoziationsrate k_{+1} in Hühnerherz-Zellmembranen gefundenen Daten (s. Abb. 12 a) liegen mit $2.0 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung.

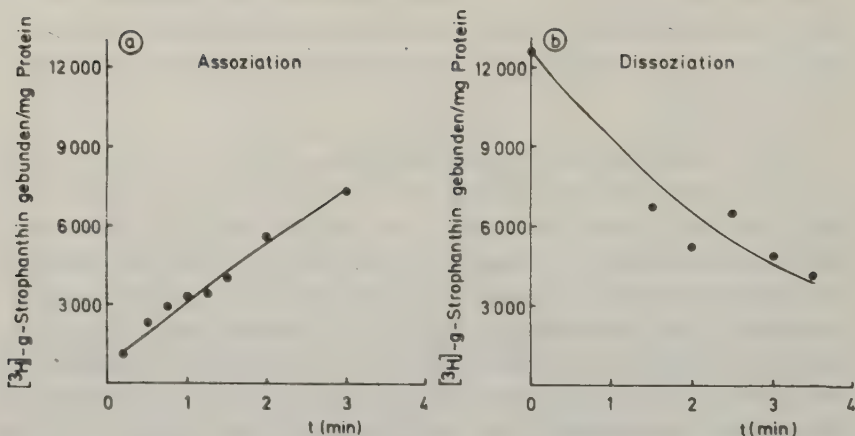


Abbildung 5: Assoziations- und Dissoziationsraten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Abb. 5 a und 5 b:

Zu verschiedenen Zeiten (s. Abszisse) wurde die Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Muskelzellen gestoppt, das zellgebundene ^3H -g-Strophanthin über Radioaktivitätszählung gemessen und auf der Ordinate in cpm/mg Protein gegen die Zeit aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4}M g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen.

Inkubationsvolumen: 4.1 ml,

Proteingehalt/Fläschchen: 0.56 mg,

Eingesetzte Radioaktivität: 3.6×10^6 cpm
($\hat{=}$ $6.2 \times 10^{-8}\text{M}$ g-Strophanthin)

Die aufgetragenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

Im selben Experiment wurde die maximale ^3H -g-Strophanthin-Bindungskapazität B_{max} und die Dissoziationskonstante K_D der ^3H -g-Strophanthin-Bindung wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben ermittelt. Es ergaben sich folgende Werte:

$B_{\text{max}} = 2.7 \text{ pmol/mg Protein};$

$K_D = 1.1 \times 10^{-7}\text{M};$

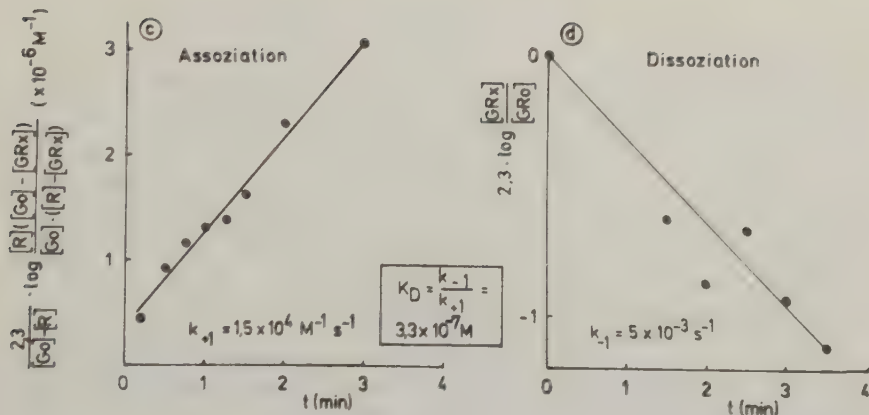


Abb. 5 c und 5 d:

Die Daten der 3H -g-Strophanthin-Assoziations- und Dissoziationskinetik wurden in die Reaktionsgleichung für Reaktionen 1. Ordnung (Abb. 5 d; Dissoziation) bzw. 2. Ordnung (Abb. 5 c; Assoziation) eingesetzt und gegen die Zeit aufgetragen. Dabei gilt für Abb. 5 c:

- a = Anfangskonzentration von g-Strophanthin im Inkubationsmedium = $6.2 \times 10^{-8} M$
- b = Gesamtkonzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen in 4.1 ml = $0.41 \times 10^{-9} M$ (Bestimmung nach Scatchard; 239)
- x = Zahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexe nach der Reaktionszeit t

Für Abb. 5 d gilt:

- a = Gesamtmenge an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen/ 4.1 ml zur Zeit $t = 0$
- a-x = Menge an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen/ 4.1 ml zur Reaktionszeit t

3.1.4.2. Bestimmung der Dissoziationsrate k_{-1}

Zur Bestimmung der Dissoziationsrate k_{-1} wurden die g-Strophanthin-Bindungsstellen der verwendeten Zellkulturen bis zu einem Gleichgewicht der Bindung abgesättigt (120 min Inkubation mit $6.2 \times 10^{-8} \text{M}$) und zu verschiedenen Zeiten (15 sec - 180 sec) das Ausmaß der Dissoziation des Herzglykosid-Moleküls von seiner Bindungsstelle in nunmehr strophanthinfreiem Medium bestimmt. Als Maß der Dissoziation diente die Messung der verbliebenen Radioaktivität zu verschiedenen Zeiten im Vergleich zur maximal gebundenen Radioaktivität zur Zeit $t = 0$.

Die Abb. 5 b zeigt, daß die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle in Hühnerherz-Muskelzellen reversibel ist und die Dissoziation sehr rasch (im Minutenbereich) erfolgt. Der Dissoziationsvorgang ist im Gegensatz zur Assoziation mit einer Reaktionskinetik 1. Ordnung vereinbar, da sich beim Einsetzen der erhaltenen Daten in die Gleichung für Reaktionen 1. Ordnung

$$k_{-1} = -2.303 \log \frac{a-x}{a} \cdot \frac{1}{t}$$

eine Gerade ergibt (Abb. 5 d). Dabei ist a die Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen zur Zeit $t = 0$ und x die Konzentration an freien Bindungsstellen zur Reaktionszeit t . Aus der Neigung der Geraden läßt sich die Dissoziationsrate k_{-1} der g-Strophanthin-Bindung im beschriebenen Versuch zu $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ errechnen.

Untersuchungen an Herzbindegewebszellen in Kultur liefern mit einer k_{-1} von $(2.8 \pm 1.6) \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ quantitativ fast identische Ergebnisse (Versuche nicht gezeigt; s. Tab. 3). Dasselbe gilt für die ergänzend durchgeführten Studien an Hühnerherz-Zellmembranen mit $k_{-1} = 1.1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ (Abb. 12 b).

Für die Dissoziationskonstante K_D - errechnet aus k_{-1}/k_{+1} - ergeben sich Werte von $3.3 \times 10^{-7} \text{M}$ für Muskelzellen (Abb. 5; Zusammenfassung in Tab. 3), $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-7} \text{M}$ für Bindegegewebszellen (Tab. 3) und $5.5 \times 10^{-7} \text{M}$ für Zellmembranen (Abb. 12).

3.1.4.3. Einfluß der Temperatur auf die ^3H -g-Strophanthin-Bindung

Um den Einfluß der Temperatur auf die g-Strophanthin-Bindung an Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur zu untersuchen, wurden die oben (3.1.4.1. und 3.1.4.2.) beschriebenen Experimente bei 9.5 - 20 - 27 - und 36 °C wiederholt. Die Assoziation des g-Strophanthin-Komplexes wurde für $t = 25 \text{ sec}$ und $t = 3 \text{ min}$, die Dissoziation für $t = 3 \text{ min}$ gemessen. Die zur weiteren Berechnung benötigte Konzentration an Glykosidbindungsstellen (B_{max}) wurde auch hier wieder durch gleichzeitige, konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin bei 37 °C bestimmt. Die Daten wurden entsprechend Kapitel 3.1.4.1. und 3.1.4.2. in die Gleichungen für Reaktionskinetiken 2.- bzw. 1. Ordnung eingesetzt und die erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsraten gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 6 a). Man erkennt, daß die Geschwindigkeitskonstanten temperaturabhängig sind, daß jedoch die Dissoziation (k_{-1}) von g-Strophanthin empfindlicher auf Temperaturänderungen reagiert als der Assoziationsprozeß (k_{+1}). Dadurch nimmt der Wert der Dissoziationskonstanten K_D mit fallender Temperatur ab. Dies wird in einer Auftragung der Dissoziationskonstanten K_D nach Arrhenius besonders deutlich (Abb. 6 b). Wäre die K_D unabhängig von der Temperatur, so müßte sich hier eine Waagrechte ergeben.

Die entsprechenden Untersuchungen wurden auch an Herzbindegewebszellen durchgeführt: Sowohl Assoziations- als auch Dissoziationsgeschwindigkeiten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung sind stark temperaturabhängig (Abb. 7 a). Das Ansteigen der Geraden für die Dissoziationskonstante K_D bei sinkender Temperatur in der Auftragung nach Arrhenius zeigt, daß sich auch bei dieser Zellart der Dissoziationsvorgang temperatursensitiver verhält als der Assoziationsvorgang von g-Strophanthin. (Abb. 7 b).

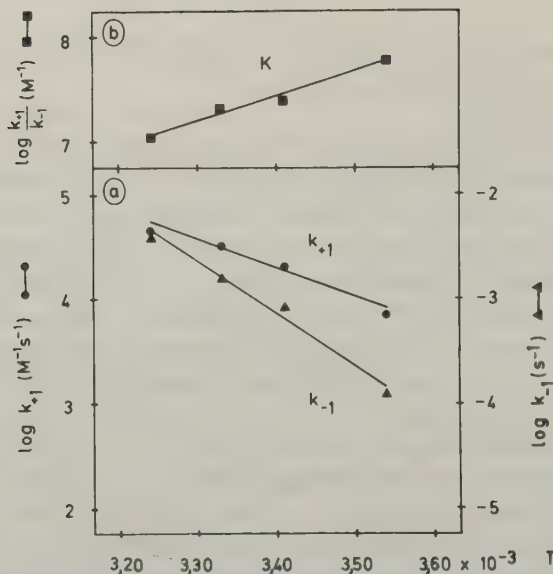


Abbildung 6: Temperaturabhängigkeit der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Abb. 6 a: Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (●—●) und Dissoziation (▲—▲) der spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung. Die Messungen wurden bei 9.5 - 20 - 27 und 36 °C in Standard-Inkubationsmedium ($[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$) durchgeführt. Die ^3H -g-Strophanthin-Assoziation wurde im Bereich von $t = 0.25 \text{ min}$ und $t = 3 \text{ min}$, die Dissoziation für $t = 3 \text{ min}$ bestimmt (s. a. Legende zu Abb. 11). Zusätzlich wurde im selben Experiment die konzentrationsabhängige ^3H -g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen und eine Auswertung der erhaltenen Daten nach Scatchard durchgeführt ($B_{\text{max}} = 1.3 \text{ pmol/mg Protein}$; $K_D = 7.9 \times 10^{-8} \text{ M}$). Die so gewonnenen Ergebnisse erlauben die Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsraten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung (s. a. METHODEN und Legende zu Abb. 5). Die Auswertung der Auftragung nach Arrhenius ergibt:

Aktivierungsenergie der Assoziation:

12.6 kcal/mol, (52.9 kJ/mol, $Q_{10} = 2.0$)

Aktivierungsenergie der Dissoziation:

23.1 kcal/mol, (96.7 kJ/mol, $Q_{10} = 3.6$).

Abb. 6 b: Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K der g-Strophanthin-Bindung (■—■). K wurde aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten (k_{+1}/k_{-1}) der Abb. 6 a berechnet. Die Auswertung nach Arrhenius ergibt eine Aktivierungsenergie von -10.7 kcal/mol (-44.8 kJ/mol, $Q_{10} = 1.8$).

Eingesetzte Radioaktivität: $3.6 \times 10^6 \text{ cpm}$ ($\hat{=} 3.5 \times 10^{-8} \text{ M } ^3\text{H}$ -g-Strophanthin); Zellprotein/ Fläschchen: 0.30 mg; Aussaatdichte: 100 000 Zellen/cm²; Inkubationsvolumen: 4.1 ml. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4} M g-Strophanthin ermittelt und von der Gesamtbindung abgezogen.

Die Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

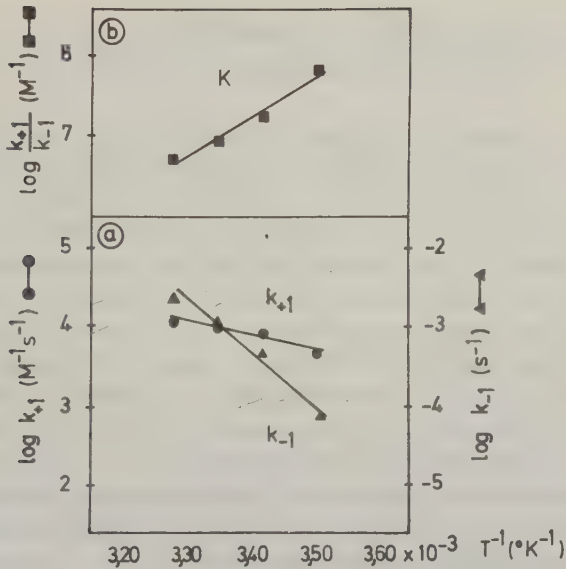


Abbildung 7: Temperaturabhängigkeit der ³H-g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Bindegewebszellen in Kultur

Abb. 7 a: Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (●—●) und Dissoziation (▲—▲) der spezifischen ³H-g-Strophanthin-Bindung. Die Messungen wurden bei 11.5 - 19 - 25 und 32 °C in Standard-Inkubationsmedium ($[K^+] = 0.75$ mM) in identischer Weise, wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung der Auftragung nach Arrhenius ergibt:

Aktivierungsenergie der Assoziation:
8.2 kcal/mol (34.3 kJ/mol; $Q_{10} = 1.6$)

Aktivierungsenergie der Dissoziation:
30.3 kcal/mol (126.8 kJ/mol; $Q_{10} = 5.4$)

Abb. 7 b: Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K der g-Strophanthin-Bindung (■—■). K wurde aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten (k_{+1}/k_{-1}) der Abb. 7 a berechnet. Die Auswertung nach Arrhenius ergibt eine Aktivierungsenergie von -22.1 kcal/mol (-92.4 kJ/mol; $Q_{10} = 3.5$).

Eingesetzte Radioaktivität: 3.9×10^6 cpm ($\approx 8.7 \times 10^{-8}$ M ³H-g-Strophanthin); Zellprotein/Fläschchen: 0.55 mg; Inkubationsvolumen: 4.1 ml. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4} M g-Strophanthin ermittelt und von der Gesamtbindung abgezogen.

Die Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

3.1.5. Einfluß von K^+ -Ionen auf die
 3H -g-Strophanthin-Bindung

3.1.5.1. Abhängigkeit der 3H -g-Strophanthin-Bindung von der
extrazellulären K^+ -Konzentration

Die Bindung von g-Strophanthin an seine Bindungsstelle ist sehr stark von der Konzentration an Kaliumionen im Inkubationsmedium abhängig. Im Experiment der Abb. 8 wurden kultivierte Hühnerherz-Muskelzellen und Bindegewebszellen für 240 min mit $6.2 \times 10^{-8}M$ 3H -g-Strophanthin in Gegenwart unterschiedlicher K^+ -Konzentrationen im Inkubationsmedium (0 mM - 20 mM) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurde die zellgebundene Radioaktivität gemessen. Ebenso wurde die unspezifische Bindung von 3H -g-Strophanthin in Gegenwart von $10^{-4}M$ nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen bestimmt.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, erreicht die spezifische 3H -g-Strophanthin-Bindung bei 0.5 mM K^+ mit 14 700 cpm/mg Protein ihr Maximum. Erhöht man die K^+ -Konzentration, so führt dies rasch zu einer Verminderung der 3H -g-Strophanthin-Bindung um 77 % bei 5.4 mM und 84 % bei 20 mM K^+ . K^+ -Ionen entfalten ihre hemmende Wirkung auf die g-Strophanthin-Bindung demnach hauptsächlich in einem Konzentrationsbereich von 0.5 - 5 mM. Hier zeigen selbst geringe Änderungen der K^+ -Konzentration einen starken Einfluß auf das Bindungsverhalten. Allerdings kann auch in Gegenwart sehr hoher K^+ -Konzentrationen die 3H -g-Strophanthin-Bindung nicht völlig verhindert werden, da die zusätzliche Inkubation mit $10^{-4}M$ g-Strophanthin zu einer weiteren Senkung des Anteils an gebundenem 3H -g-Strophanthin auf 5 % der maximalen Bindung führt (s. Legende zu Abb. 8). Die bei dieser Glykosidkonzentration verbleibende Bindung von 5 % ist dabei unabhängig von der K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium (gemessen für $[K^+] = 0 - 5.4 - 20$ mM). Dies spricht dafür, daß es sich bei der in Gegenwart von $10^{-4}M$ g-Strophanthin bestimmten, gebundenen Radioaktivität wirklich nur um nicht-spezifische Bindungsvorgänge (Adhäsionen an Zellbestandteile) sowie um Reste nicht ausgewaschenen radioaktiven

Materials in der interzellulären Flüssigkeit und am Versuchsfäschchen ("unspezifische Bindung"; s. 2.1.3.3.) handeln kann.

Die Ursache des starken Abfalls der ^3H -g-Strophanthin-Bindung bei sehr niedrigen ($< 0.5 \text{ mM}$) K^+ -Konzentrationen ist noch nicht geklärt. Dieses Phänomen wird nur an der intakten Herzzelle gefunden (neben Hühnerzellen auch für Rattenherzzellen beschrieben; 288) und läßt sich an Zellmembranen nicht beobachten (75). Möglicherweise ist es auf eine Beschädigung oder Zerstörung zumindest eines Teiles der Zellen während der Inkubation in kaliumfreier oder kaliumarmer Lösung zurückzuführen.

In Herzbindegewebszellen ergibt sich unter identischen Versuchsbedingungen ein ganz ähnliches Bild für die ^3H -g-Strophanthin-Bindung bei verschiedenen K^+ -Konzentrationen (Abb. 8). Auch hier findet sich die oben beschriebene Abnahme der ^3H -g-Strophanthin-Bindung bei sehr niedrigen K^+ -Gehalten ($< 0.75 \text{ mM}$). Die maximale Bindung erfolgt bei $[\text{K}^+] = 0.5 \text{ mM}$. Sie wird durch 20 mM K^+ um 71 % vermindert. Für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Bindungsexperimente wurde, soweit nicht anders angegeben, eine K^+ -Konzentration von 0.75 mM im Inkubationsmedium eingestellt, da in diesem Bereich die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die intakte Hühnerherzzelle maximal groß ist und gleichzeitig eine dauerhafte Schädigung der Zellen ausgeschlossen werden kann (287).

3.1.5.2. Einfluß von K^+ -Ionen auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin

Die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an intakte Hühnerherzzellen wurde in Gegenwart verschiedener K^+ -Konzentrationen ($0.75 - 2.5 - 3.5 \text{ mM}$) studiert und dabei jeweils die maximale Bindungskapazität (B_{max}) sowie die Dissoziationskonstante (K_D) der ^3H -g-Strophanthin-Bindung ermittelt. Die experimentelle Durchführung erfolgte, wie in 2.1.3.2. beschrieben.

Abb. 9 zeigt die Auftragung der für die spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Muskelzellen erhaltenen Daten nach Scatchard (239). Danach erhöht sich die Dissoziationskonstante (K_D) der Glykosidbindung von $1.9 \times 10^{-7}\text{M}$ bei 0.75 mM K^+ auf $3.5 \times 10^{-7}\text{M}$ bei 2.5 mM K^+ . Die Affinität zwischen g-Strophanthin und seiner Bindungsstelle sinkt also beim Ansteigen der K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium ab. Dagegen ist die maximale Bindungskapazität (B_{max}) der Zellen mit 3.3 pmol/mg Protein in beiden Fällen gleich hoch. An Bindegewebszellen des Hühnerherzens durchgeführte Untersuchungen liefern quantitativ identische Ergebnisse (Abb. 10): Während die K_D bei Erhöhung der K^+ -Konzentration von 0.75 mM auf 3.5 mM von $2.1 \times 10^{-7}\text{M}$ auf $3.6 \times 10^{-7}\text{M}$ ansteigt, verändert sich der Wert der B_{max} nicht wesentlich ($1.8 \text{ pmol/mg Protein}$ bei 0.75 mM - $1.9 \text{ pmol/mg Protein}$ bei 3.5 mM K^+).

3.1.5.3. Einfluß von K^+ -Ionen auf die Geschwindigkeitskonstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung

Durch Messung der Assoziations- und Dissoziationsraten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart verschiedener K^+ -Konzentrationen sollte der Frage nachgegangen werden, welche Phasen der Bindung (Assoziation, Dissoziation, beide Prozesse) durch K^+ -Ionen beeinflusst werden. An Hühnerherz-Muskelzellen wurden daher Assoziation und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin im Zeitraum von 3 min und bei einem K^+ -Gehalt im Inkubationsmedium von $0.75 - 3.5 - 5.4 \text{ mM}$ bestimmt (s. 3.1.4.1. und 3.1.4.2.). In Gegenwart von 5.4 mM K^+ beträgt die innerhalb von 3 min in Form von ^3H -g-Strophanthin an die Zelle gebundene Radioaktivität weniger als 30 % der Bindung bei 0.75 mM K^+ , während der Dissoziationsvorgang von extrazellulären Veränderungen des K^+ -Gehaltes weitgehend unbeeinflusst bleibt oder sogar mit zunehmendem K^+ leicht ansteigt (Abb. 11). Ein qualitativ ganz ähnliches Ergebnis liefert die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten an Hühnerherz-Zellmembranhomogenaten in Gegenwart von 0 mM und 3 mM KCl : Die Assoziationsrate für die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle nimmt in Gegenwart von 3 mM K^+ ($k_{+1} = 3.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) im Vergleich zur Kontrollmessung bei 0 mM K^+ ($k_{+1} = 2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) sehr stark ab (Abb. 12 a).

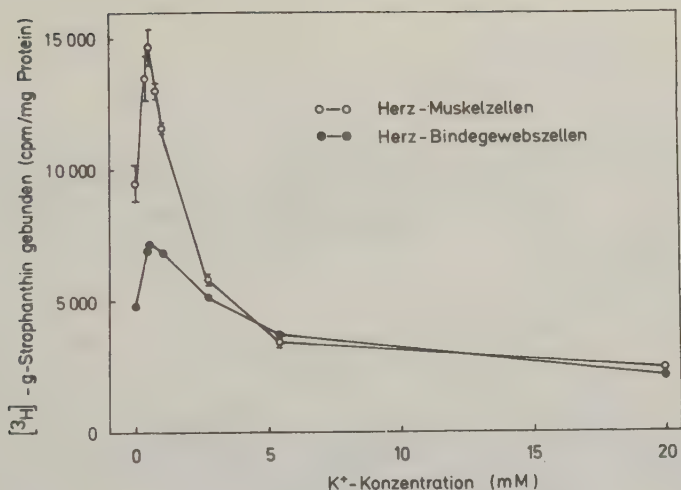


Abbildung 8: Einfluß von Kalium auf die ³H-g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühnerherzzellen unter Gleichgewichtsbedingungen

Hühnerherzzellen wurden für 240 min bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % dialysiertes Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium in Gegenwart von ³H-g-Strophanthin und den angegebenen K⁺-Konzentrationen (0 - 20 mM) inkubiert. Die eingesetzte Radioaktivität, die g-Strophanthin-Konzentration und der Zellproteingehalt pro Kulturfläschchen betragen:

Muskelzellen: 3.4×10^6 cpm; 6.2×10^{-8} M; 0,40 mg;

Bindegewebszellen: 3.7×10^6 cpm; 3.6×10^{-8} M; 0.80 mg;

Das Inkubationsvolumen war 4.1 ml/Kulturfläschchen. Für die unspezifische ³H-g-Strophanthin-Bindung (cpm/mg Protein) ergab sich: 1242 für [K] = 0 mM; 855 für [K] = 5.4 mM; 730 für [K] = 20 mM in Muskelzellen (gemessen in Gegenwart von 10^{-4} M g-Strophanthin) und 895 für [K] = 20 mM in Bindegewebszellen (gemessen in Gegenwart von 10^{-2} M g-Strophanthin).

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte + SD (n = 3) bei Herz-muskelzellen und Mittelwerte eng korrelierender Doppelwerte bei Herzbindegewebszellen.

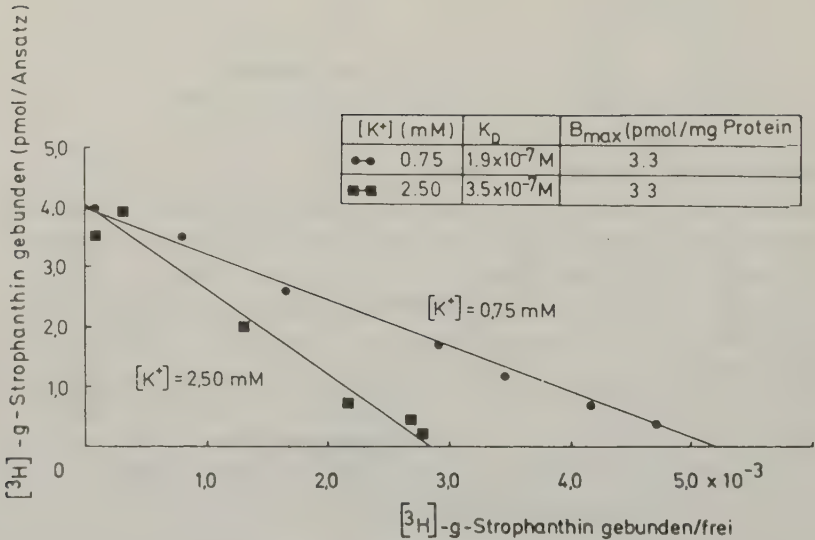


Abbildung 9: Einfluß von Kalium auf die spezifische, konzentrationsabhängige ³H-g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Die spezifische, konzentrationsabhängige Bindung von ³H-g-Strophanthin wurde - wie in der Legende zu Abb. 3 und in METHODEN beschrieben - bei einer K-Konzentration von 0.75 bzw. 2.5 mM bestimmt und die Daten nach Scatchard (239) aufgetragen.

Inkubationsvolumen: 4.1 ml;
 Aussaatdichte: 120 000 Zellen/cm²;
 Zellprotein/Fläschchen: 1.22 mg;
 eingesetzte Radioaktivität: 0.46 × 10⁶ cpm ($\hat{=}$ 1.1 × 10⁻⁸ M g-Strophanthin); 0.92 × 10⁶ cpm ($\hat{=}$ 2.2 × 10⁻⁸ M g-Strophanthin); 1.84 × 10⁶ cpm ($\hat{=}$ 4.4 × 10⁻⁸ M g-Strophanthin) und 3.7 × 10⁶ cpm ($\hat{=}$ 8.8 × 10⁻⁸ M g-Strophanthin) für alle weiteren Meßwerte. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10⁻⁶ M g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

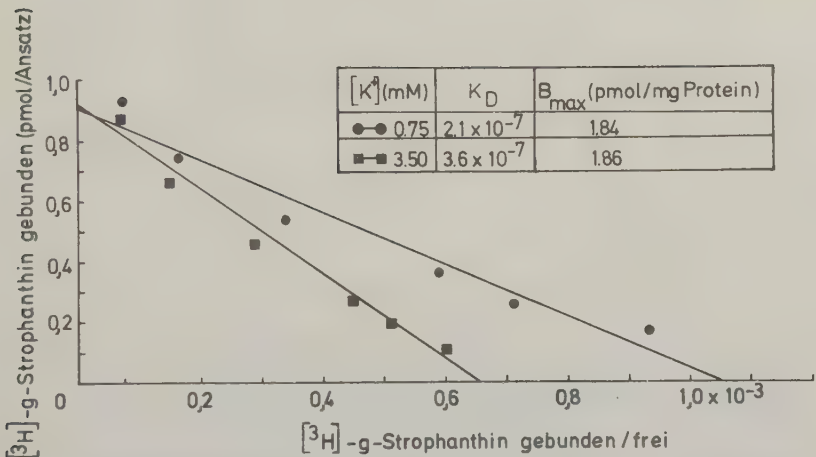


Abbildung 10: Einfluß von Kalium auf die spezifische, konzentrationsabhängige 3H -g-Strophanthin-Bindung in Hühnerherz-Bindegewebszellen in Kultur

Die spezifische, konzentrationsabhängige Bindung von 3H -g-Strophanthin wurde - wie in der Legende zu Abb. 3 und in METHODEN beschrieben - bei einer K^+ -Konzentration von 0.75 bzw. 3.5 mM bestimmt und die Daten nach Scatchard (239) aufgetragen.

Inkubationsvolumen: 4.1 ml;
 Zellprotein/Fläschchen: 0.48 mg;
 eingesetzte Radioaktivität: 1.05×10^6 cpm ($\hat{=}$ $2.2 \times 10^{-8} M$ g-Strophanthin); 2.10×10^6 cpm ($\hat{=}$ $4.4 \times 10^{-8} M$ g-Strophanthin) und 4.20×10^6 cpm ($\hat{=}$ $8.8 \times 10^{-8} M$ g-Strophanthin) für alle weiteren Meßwerte. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von $10^{-6} M$ g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte.

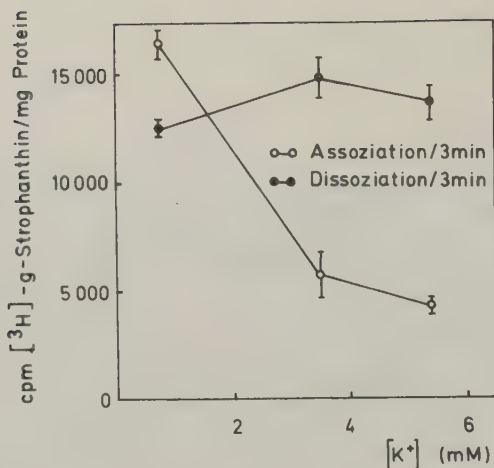


Abbildung 11: Einfluß von Kalium auf die g-Strophanthin-Assoziation und -dissoziation in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Für die Untersuchung wurden Hühnerherz-Muskelzellen (Aussaatdichte 116 000 Zellen/Fläschchen) für 240 min bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($[K^+] = 0.75 \text{ mM}$) vorinkubiert.

Assoziation: Anschließend wurden die Kulturen mit ^3H -g-Strophanthin ($3.6 \times 10^6 \text{ cpm/Kulturfläschchen}$, $\approx 6.7 \times 10^{-8} \text{ M}$ g-Strophanthin) in Gegenwart der angegebenen K^+ -Konzentrationen (s. Abszisse) inkubiert. Zur Zeit $t = 3 \text{ min}$ wurde die Assoziation des Glykosids gestoppt und das spezifisch gebundene ^3H -g-Strophanthin in cpm/mg Protein bestimmt (s. Ordinate).

Dissoziation: Nach Vorinkubation (s. o.) wurden die Zellkulturen für 120 min bei einer K^+ -Konzentration von 0.75 mM mit ^3H -g-Strophanthin ($3.6 \times 10^6 \text{ cpm/Kulturfläschchen}$, $\approx 6.7 \times 10^{-8} \text{ M}$) inkubiert. Anschließend wurde das nicht zellgebundene ^3H -g-Strophanthin ausgewaschen und die Zellen in strophanthinfreiem Inkubationsmedium in Gegenwart der angegebenen K^+ -Konzentration weiter inkubiert. Zur Zeit $t = 3 \text{ min}$ wurde das noch zellgebundene ^3H -g-Strophanthin ermittelt und in cpm/mg Zellprotein aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen. Der Zellproteingehalt betrug 1.30 mg/Fläschchen, das Inkubationsvolumen war 4.1 ml.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte $\pm$ SD ($n = 3$).

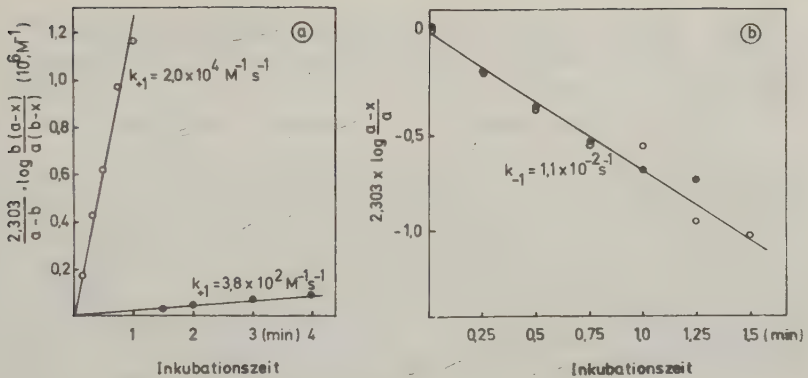


Abbildung 12: Assoziation und Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin in Zellmembranen embryonaler Hühnerherzen - Einfluß von Kalium

Abb. 12 a: Bestimmung der Assoziationsrate k_{+1} :

Herzzellmembranen (0,24 mg Protein, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität} = 0,14 \text{ pmol hydrolysiertes ATP/min} \times \text{mg Protein}$ bei 37°C) wurden mit 3 mM MgCl_2 , $3 \text{ mM Imidazol/PO}_4$, $5,6 \text{ nM } ^3\text{H-g-Strophanthin}$ und 3 mM KCl (●—●) bzw. ohne KCl (○—○) in $50 \text{ mM Imidazol/HCl}$ ($\text{pH} = 7,25$; 37°C ; Gesamtvolumen $2,0 \text{ ml}$) für die angegebenen Zeiten (s. Abszisse) inkubiert. Anschließend wurde das zellgebundene $^3\text{H-g-Strophanthin}$ mittels Filtration (s. METHODEN) bestimmt und die erhaltenen Daten in die Gleichung einer Reaktionskinetik 2. Ordnung eingesetzt (s. 3.1.4.1.). Die Auftragung der so errechneten Daten gegen die Zeit ergibt zwei Geraden. Aus deren Steigung läßt sich k_{+1} ohne ($2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) und in Gegenwart von 3 mM K^+ ($3,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) ermitteln (nähere Erläuterungen s. Text).

Abb. 12 b: Bestimmung der Dissoziationsrate k_{-1} :

Herzzellmembranen (0,58 mg Protein, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität} = 0,14 \text{ pmol hydrolysiertes ATP/min} \times \text{mg Protein}$ bei 37°C) wurden mit 3 mM MgCl_2 , $3 \text{ mM Imidazol/PO}_4$ und $1,9 \times 10^{-8} \text{ M } ^3\text{H-g-Strophanthin}$ in $50 \text{ mM Imidazol/HCl}$ ($\text{pH} = 7,25$; 37°C ; Gesamtvolumen $12,0 \text{ ml}$) für 120 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Membranen für 30 min bei $100\,000 \text{ g}$ und die Suspendierung des Sediments in $12 \text{ ml H}_2\text{O}$ (0°C). Ein Teil dieser Suspension (jeweils $0,2 \text{ ml}$, $1,0 \text{ mg Protein}$) wurde nun mit 3 mM MgCl_2 , $3 \text{ mM Imidazol/PO}_4$, $10^{-4} \text{ M g-Strophanthin}$ und 3 mM KCl (●—●) bzw. ohne KCl (○—○) in $50 \text{ mM Imidazol/HCl-Puffer}$ ($\text{pH} = 7,25$; 37°C , Gesamtvolumen $2,0 \text{ ml}$) weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten (s. Abszisse) wurde der membrangebundene Anteil an $^3\text{H-g-Strophanthin}$ mit Hilfe der "Schnellen Filtrationsmethode" (s. METHODEN) bestimmt, die Meßwerte in die Gleichung einer Reaktionskinetik 1. Ordnung eingesetzt und gegen die Zeit aufgetragen.

Dagegen ergeben sich sowohl für 0 mM als auch für 3 mM K^+ mit jeweils $1.1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ völlig identische Dissoziationsraten (Abb. 12 b).

Nach den sowohl in Hühnerherz-Muskelzellkulturen als auch in Hühnerherz-Zellmembranen übereinstimmend vorliegenden Befunden ist damit allein eine Hemmung der g-Strophanthin-Assoziationsreaktion für das Absinken der Affinität und das damit verbundene Ansteigen der Dissoziationskonstanten K_D in Gegenwart von K^+ -Ionen verantwortlich. Der Vorgang der Dissoziation scheint dagegen von K^+ -Ionen weitgehend unbeeinflusst.

3.1.6. Aktivierungsenergien der ^3H -g-Strophanthin-Bindung

Die Bindung von Herzglykosiden an ihre spezifische Bindungsstelle stellt eine Reaktion dar, die einer Aktivierungsenergie bedarf (46, 106, 138, 268). Dies kann auch für das Versuchsmodell der intakten Hühnerherzzelle vermutet werden, da die Geschwindigkeit, mit der das g-Strophanthin-Molekül mit seiner Bindungsstelle reagiert, mit steigender Temperatur zunimmt (s. 3.1.4.3).

Der Zusammenhang von Aktivierungsenergie und Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion läßt sich mit der von Arrhenius 1889 angegebenen Gleichung beschreiben:

$$k = A \cdot e^{E_a / RT}$$

Nach Logarithmieren ergibt sich:

$$\ln k = A - \frac{E_a}{RT}$$

In dieser Gleichung bedeutet: k = Gleichgewichtskonstante
 E_a = Aktivierungsenergie
 R = allgemeine Gaskonstante
 T = absolute Temperatur
 A = Proportionalitätsfaktor;
konstant

Bei der Arrheniusgleichung handelt es sich um eine Geradengleichung. Trägt man den natürlichen Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten k gegen $1/T$ auf, d. h. gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur, so ergibt die Neigung der Geraden den Wert von E_a/R . Da der Zahlenwert R bekannt ist ($8.316 \text{ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), kann die Aktivierungsenergie der g-Strophanthin-Bindung berechnet werden: Sie beträgt für den Assoziationsvorgang der g-Strophanthin-Bindung an Hühnerherz-Muskelzellen 53 kJ/mol ($Q_{10} = 2.0$), zur Lösung der g-Strophanthin-Bindung sind 97 kJ/mol ($Q_{10} = 3.6$) nötig, für das Gleichgewicht der Bindung ergibt das in Abb. 6 gezeigte Experiment einen Wert von -45 kJ/mol ($Q_{10} = 1.8$).

Eine Zusammenfassung der Daten aller durchgeführten Experimente sowie eine Gegenüberstellung der an Muskel- und Bindegewebszellen erhaltenen Ergebnisse gibt Tab. 3.

3.1.7. Zahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen in der intakten Hühnerherzzelle

Unter der Voraussetzung, daß eine g-Strophanthin-Bindungsstelle nur ein Glykosidmolekül spezifisch bindet (19, 79, 99, 237), kann bei Kenntnis der maximalen g-Strophanthin-Bindungs-kapazität/mg Zellprotein (s. Tab. 2) und des Verhältnisses von Zellprotein zu Zelle (s. 2.1.6.) errechnet werden, wieviele Glykosidbindungsstellen sich auf einer Hühnerherzzelle befinden. Eine solche Rechnung ergibt für Herzmuskelzellen eine Besetzung von ca. 860 000 Bindungsstellen je Zelle. Die Zahl der vorhandenen Bindungsstellen ist in Bindegewebszellen mit ca. 300 000 je Zelle deutlich geringer. Auf μm^2 Zellmembranoberfläche bezogen (Daten s. 2.1.6.), ergibt sich daraus eine Bindungsstellendichte von $430/\mu\text{m}^2$ für Muskelzellen und $300/\mu\text{m}^2$ für Bindegewebszellen.

3.2. Einfluß von g-Strophanthin auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase

Eine spezifische Bindungsstelle kann nur dann als Rezeptor bezeichnet werden, wenn die Besetzung der Bindungsstelle durch einen Liganden eine physiologische oder pharmakologische

Wirkung hervorruft (82). Am Ventrikelstreifen aus Hühnerherzen beispielsweise führt die Bindung von Herzglykosiden zu einer Zunahme der Kontraktionskraft, was die Existenz eines spezifischen Herzglykosid-Rezeptors an diesem Untersuchungsobjekt beweist (157). Auch für aus Hühnerherzen gewonnenen Herzmuskelzellen in Kultur wurde ein physiologischer Effekt des g-Strophanthins in Form einer Zunahme der Kontraktilität bereits nachgewiesen (s. 4.1.2.3.).

Neben der Kontraktionskraftsteigerung ist als zweite Wirkung von Digitalis eine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ bereits für viele Organe und Tierspezies verlässlich belegt (s. EINLEITUNG).

Für die Hühnerherzzelle in Kultur und für Hühnerherz-Zellmembranen soll im folgenden gezeigt werden, daß auch hier die Bindung von g-Strophanthin eine hemmende Wirkung auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität hat und daß damit die unter Kapitel 3.1. eingehend charakterisierte g-Strophanthin-Bindungsstelle als spezifischer Herzglykosid-Rezeptor aufgefaßt werden kann.

3.2.1. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch g-Strophanthin in Hühnerherz-Zellmembranen

Die Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität mittels des gekoppelten enzymatischen Tests (s. METHODEN) in Gegenwart von g-Strophanthin zeigt, daß steigende Konzentrationen an g-Strophanthin zu einer deutlichen Hemmung der Enzymaktivität führen (Abb. 4 a). Bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ g-Strophanthin ist nur noch 50 % der ursprünglichen ATPase-Aktivität meßbar. Vergleicht man diesen IC_{50} -Wert mit der Dissoziationskonstante K_D der g-Strophanthin-Bindung (Abb. 4 b), so stellt man fest, daß eine 50 %ige Besetzung der Herzglykosid-Bindungsstellen (Teil der Na^+ -Pumpe) durch g-Strophanthin bereits bei einer 8fach niedrigeren Konzentration ($4.3 \times 10^{-7} \text{ M}$) erreicht ist.

3.2.2. Hemmung des aktiven ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transportes durch g-Strophanthin in Hühnerherz-Zellkulturen

3.2.2.1. Auswirkungen von g-Strophanthin auf die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme

Als Meßparameter für die Aktivität der Na^+ -Pumpe an der intakten Zelle dient der aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einwärtstransport über die Zellmembran (über die Berechtigung des Einsatzes von Rubidium als Kaliumanalogon s. 2.1.4.). Um diesen Transport zu messen, wurden Hühnerherzzellen in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an g-Strophanthin ($0 \text{ M} - 10^{-3} \text{ M}$) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert ($[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$) und anschließend über 10 min die aktive Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ über die Membran gemessen (s. METHODEN).

Wie schon bei Hühnerherz-Zellmembranen, zeigt sich eine klare Abhängigkeit der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten ($\text{nmol/mg Protein} \times \text{min}$) von der extrazellulären g-Strophanthin-Konzentration (Abb. 13 a/13 b). Die maximale Hemmung des Enzyms tritt bei g-Strophanthin-Konzentrationen $> 10^{-5} \text{ M}$ auf und beträgt dann mehr als 95 % der maximalen, in strophanthin-freiem Medium gemessenen Aufnahme (Kontrolle). Daraus kann gefolgert werden, daß bei der hier gewählten, niedrigen K^+ -Konzentration von 0.75 mM mehr als 95 % des Kaliumeinstroms in die Zelle Folge eines aktiven Transportprozesses der Na^+ -Pumpe sind. Eine Zusammenfassung der in mehreren Experimenten erhaltenen Werte für die maximale ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate in Hühnerherzzellen bei $[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$ wird in Tab. 2 gegeben. Die halbmaximale Hemmung der Na^+ -Pumpe (IC_{50}) tritt in Gegenwart von $5.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Muskelzellen) bzw. $2.6 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Bindegewebszellen) auf. Stellt man diesen Zahlen die jeweiligen Dissoziationskonstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung gegenüber (Muskelzellen: $K_D = 1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$; Bindegewebszellen: $K_D = 1.9 \times 10^{-7} \text{ M}$; s. a. Tab. 2), so ergibt sich, daß im IC_{50} -Bereich der Na^+ -Pumpe in Bindegewebszellen auch etwa 50 % der Bindungsstellen für g-Strophanthin besetzt sind. Dagegen ist in

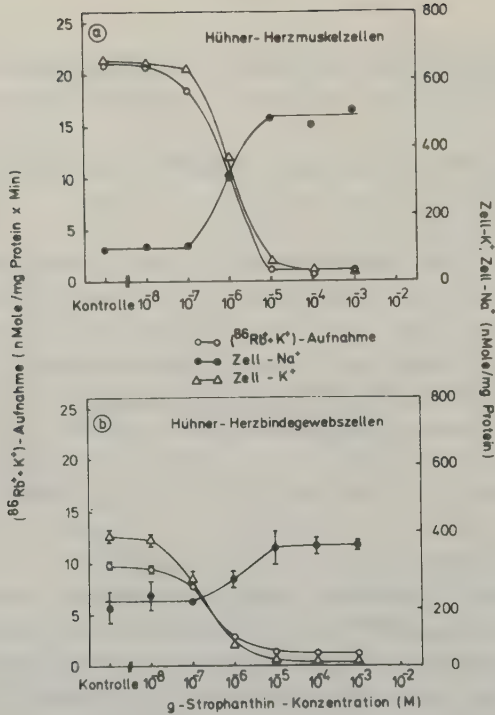


Abbildung 13: Einfluss von g-Strophanthin auf die Aktivität der Natrium-Pumpe in kultivierten Hühnerherz-zellen

Hühnerherz-Muskelzellen (Aussaatdichte: 90 000 Zellen/Fläschchen) und Hühnerherz-Bindegewebszellen derselben Präparation wurden für 240 min bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$) in Gegenwart steigender Konzentrationen von g-Strophanthin (s. Abszisse) inkubiert. Anschließend wurde unter Verwendung des Isotops $^{86}\text{Rb}^+$ als K^+ -Analogon die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme der Zellen über 10 min ermittelt und in nmol/mg Protein x min aufgetragen. Der zelluläre K^+ -Gehalt wurde flammenphotometrisch bestimmt. Der zelluläre Na^+ -Gehalt ergab sich durch Messung von $^{22}\text{Na}^+$ unter Gleichgewichtsbedingungen (Nähere Einzelheiten der Bestimmung s. a. METHODEN).

Die eingesetzte Radioaktivität bzw. der Zellproteingehalt/Fläschchen betrugen für Herzmuskelzellen (Abb. 13 a): $1.91 \times 10^6 \text{ cpm } ^{86}\text{Rb}^+$; $7.61 \times 10^6 \text{ cpm } ^{22}\text{Na}^+$; 0.65 mg; und für Herzbindegewebszellen (Abb. 13 b): $1.51 \times 10^6 \text{ cpm } ^{86}\text{Rb}^+$; $14.25 \times 10^6 \text{ cpm } ^{22}\text{Na}^+$; 0.30 mg.

Die für den zellulären K^+ -Gehalt angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ ($n = 4 - 16$); ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten und zellulärer Na^+ -Gehalt sind als Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte (Abb 13 a) bzw. als Mittelwerte $\pm \text{SD}$ ($n = 3$; Abb. 13 b) angegeben.

Muskelzellen, ähnlich wie in Zellmembranen (vgl. 3.2.1.), eine mehr als 50 %ige Besetzung der Bindungsstellen nötig, um den aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transport halbmaximal zu inhibieren. Es kann somit festgestellt werden, daß g-Strophanthin die Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase zwar eindeutig konzentrationsabhängig, jedoch nicht unbedingt parallel zur Besetzung seiner spezifischen Bindungsstellen vermindert (s. a. 3.3. und 4.3.).

Die bisher zu diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden unter Gleichgewichtsbedingungen für die g-Strophanthin-Bindung durchgeführt. Aber auch unter kinetischen Meßbedingungen läßt sich der Zusammenhang von g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der Na^+ -Pumpe nachweisen. In dem an Hühnerherz-Muskelzellen durchgeführten Experiment der Abb. 14 wurde die Dissoziation von ^3H -g-Strophanthin zu einer dadurch hervorgerufenen Reaktivierung der zuvor durch die Bindung zu 40 % gehemmten Na^+ -Pumpe in Beziehung gesetzt. Beide Prozesse verlaufen parallel und weisen Halbwertszeiten von jeweils 1 - 3 min (37 °C) auf. Dies bedeutet, daß bei der gewählten Glykosidkonzentration von $5 \times 10^{-7}\text{M}$ bereits nach 1 - 3 min die Hälfte des gebundenen g-Strophanthins seine Bindungsstelle verlassen hat und gleichzeitig 50 % der gehemmten Pumpaktivität reaktiviert wurde. Die geschilderten Befunde belegen damit eindeutig, daß der g-Strophanthin-Bindung im embryonalen Hühnerherzen eine spezifische Wirkung in Form einer Hemmung des ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Enzymsystems zugeordnet werden kann.

3.2.2.2. Auswirkung von g-Strophanthin auf den intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalt

Als Folge der strophanthinbedingten Hemmung des aktiven Kationentransports und des damit verbundenen Zusammenbruchs des transmembranalen Ionengradienten steigt die zelluläre Na^+ -Konzentration (gemessen mit $^{22}\text{Na}^+$) unter g-Strophanthin an, während die zelluläre K^+ -Konzentration (flammenphotometrische Bestimmung; s. METHODEN) stark absinkt (Abb. 13 a: Muskelzellen; Abb. 13 b: Bindegewebszellen). Dabei stimmen die IC_{50} -Werte für diesen Effekt gut mit der g-Strophanthin-Konzentration überein, die auch eine 50 %ige Hemmung der aktiven

Tabelle 2: Eigenschaften der spezifischen g-Strophanthin-Bindungsstelle und des strophanthinsensitiven Kationentransports in Zellkulturen embryonaler Hühnerherzen

	MUSKEL- ZELLEN	BINDEGEWEBS- ZELLEN
<u>^3H-g-Strophanthin-Bin-</u> <u>dungsstellen</u> (B_{max})	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.1
(pmol/mg Protein)		
<u>Dissoziationskonstante</u>	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
(K_D) der ^3H -g-Stro-		
phanthin-Bindung (M)		
IC_{50} der Hemmung der	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^{-7}$
($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme		
durch g-Strophanthin (M)		
IC_{50} der Senkung des	$(6.7 \pm 0.8) \times 10^{-7}$	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-7}$
<u>zellulären K^+-Gehaltes</u>		
durch g-Strophanthin (M)		
IC_{50} der Zunahme des	$(7.4 \pm 1.2) \times 10^{-7}$	$(6.9 \pm 1.2) \times 10^{-7}$
<u>zellulären Na^+-Gehaltes</u>		
durch g-Strophanthin (M)		
($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme	15.4 ± 1.2	7.5 ± 0.8
(nmol/mg Protein x min)		

Die Tabelle faßt die Ergebnisse mehrerer Experimente, wie sie in den Abbildungen 3 und 13 gezeigt sind, zusammen. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n = 5-17 Experimente mit jeweils Dreifach-Bestimmungen)

Tabelle 3: Kinetische und thermodynamische Konstanten der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Hühnerherzzellen

	MUSKEL- ZELLEN	BINDEGEWEBS- ZELLEN
<u>Assoziationsrate</u> k_{+1} ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$); 37 °C	$(3.2 \pm 1.6) \times 10^4$	$(2.2 \pm 1.6) \times 10^4$
<u>Dissoziationsrate</u> k_{-1} (sec^{-1}); 37 °C	$(4.5 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	$(2.8 \pm 1.6) \times 10^{-3}$
<u>Dissoziationskonstante</u> $K_D = k_{-1}/k_{+1}$ (M); 37 °C	$(1.9 \pm 1.3) \times 10^{-7}$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-7}$
<u>Aktivierungsenergie</u> E_a <u>der Assoziation</u> (kJ/Mol); 9 - 36 °C	56.1 ± 10.4 (Q_{10} 2.1)	36.5 (Q_{10} 1.7)
<u>Aktivierungsenergie</u> E_a <u>der Dissoziation</u> (kJ/Mol); 9 - 36 °C	106.5 ± 20.4 (Q_{10} 4.2)	92.5 (Q_{10} 3.8)
<u>Aktivierungsenergie</u> E_a <u>der Gleichgewichts-</u> <u>bindung</u> (kJ/Mol); 9 - 36 °C	-62.7 ± 31.1 (Q_{10} 2.5)	-56.2 (Q_{10} 2.4)

Die Tabelle faßt die Ergebnisse mehrerer Experimente, wie sie in Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 7 gezeigt sind, zusammen. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD ($n = 3 - 5$) für Muskelzellen und Mittelwerte $\pm$ SD ($n = 3$) sowie Mittelwerte eng korrelierender Zweifachwerte für Bindegewebszellen.

($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme bewirkt. Eine Gegenüberstellung der Daten für Muskelzellen und Bindegewebszellen findet sich in Tab. 2.

3.3. Korrelation von g-Strophanthin-Bindung, Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase und intrazellulärem K^+ -Gehalt

In Muskel- und Bindegewebszellen wurde das Ausmaß der g-Strophanthin-Bindung bei verschiedenen Konzentrationen dieses Glykosids ermittelt und zu der im gleichen Experiment gemessenen, zugehörigen Hemmung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes in Beziehung gesetzt (Abb. 15). Neun bzw. fünf Einzelexperimente dieser Art bilden die Grundlage für die in Abb. 16 gezeigte Korrelation von g-Strophanthin-Bindung (in % der maximalen Bindung) und Hemmung der Na^+ -Pumpe (in % des maximalen ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes bzw. des intrazellulären K^+ -Gehaltes) in Muskel- und Bindegewebszellen.

Die Durchführung und Auswertung der Versuche soll exemplarisch an Hand des in Abb. 15 gezeigten Experiments mit Hühnerherz-Bindegewebszellen erläutert werden: Mit einem Teil der zur Verfügung stehenden Kulturfläschchen wurde die konzentrationsabhängige Bindung von $8.7 \times 10^{-8}\text{M}$ ^3H -g-Strophanthin in Gegenwart steigender Konzentrationen nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins ($6 \times 10^{-8} - 10^{-5}\text{M}$) - wie in Kapitel 3.1.3. beschrieben - bestimmt. Die erhaltene spezifische Bindung kann für jede g-Strophanthin-Konzentration in pmol/mg Protein aufgezeichnet werden (Abb. 15; *—*). Bei Auftragung nach Scatchard errechnet sich eine maximale Bindungskapazität von 2.3 pmol/mg Protein und eine Dissoziationskonstante K_D von $1.4 \times 10^{-7}\text{M}$. Obwohl diese Daten bereits als Mittelwerte mehrerer Versuche vorliegen (s. Tab. 2), wurden sie für jede Präparation und damit für jedes in diesem Zusammenhang durchgeführte Experiment neu ermittelt.

Für die Korrelation der ^3H -g-Strophanthin-Bindung mit der Hemmung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes mußte zunächst für jede Konzentration an g-Strophanthin das Ausmaß der Absättigung der spezifischen g-Strophanthin-Bindungsstellen

ermittelt werden. Dies ist bei Kenntnis von K_D und $B_{\max}$ über das Massenwirkungsgesetz möglich:

$$K_D = \frac{S \cdot R}{SR}$$

wobei

S = Konzentration an g-Strophanthin

R = Konzentration an freien g-Strophanthin-Bindungsstellen

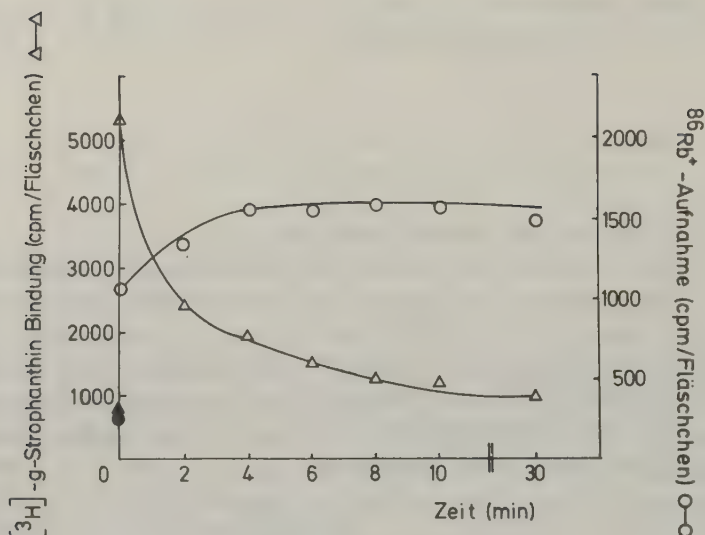
SR = Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen

Da R durch $(B_{\max} - SR)$ ersetzt werden kann, läßt sich nach Umformung der Gleichung für jede g-Strophanthin-Konzentration (S) die zugehörige Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen (SR) berechnen:

$$SR = \frac{S \cdot B_{\max}}{K_D + S}$$

Die Konzentration an SR kann dabei in pmol/mg Protein oder auch in Prozent der maximalen g-Strophanthin-Bindungskapazität ($B_{\max}$) ausgedrückt und aufgetragen werden (Abb. 16). Umgekehrt können diejenigen g-Strophanthin-Konzentrationen ermittelt werden, bei denen genau 10, 20, 30 ... 90 % der Bindungsstellen mit g-Strophanthin besetzt sind. So errechnet sich beispielsweise bei dem gezeigten Versuch an Bindegewebszellen, daß eine 20 %ige Absättigung der Bindungsstellen durch eine g-Strophanthin-Konzentration von $3.5 \times 10^{-8}M$, eine 70 %ige Absättigung durch eine g-Strophanthin-Konzentration von $3.3 \times 10^{-7}M$ erreicht wird (Abb. 17).

Im 2. Teil des Experiments wurde die Aktivität der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase (in Form der aktiven $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme) und der intrazelluläre K^+ -Gehalt in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration ($0 M - 10^{-3}M$) gemessen (Abb. 15; ●—●; □—□). Aus einer solchen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung können nun graphisch für diejenigen Konzentrationen an g-Strophanthin, die (wie oben berechnet) zu einer 10, 20, 30 ... 90 %igen Besetzung der Bindungsstellen führen, die entsprechenden Daten



Abbildungung 14: Zeitliche Korrelation von g-Strophanthin-Dissoziation und Reaktivierung der Na⁺-Pumpe in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur

Hühnerherz-Muskelzellen (Aussaatdichte: 366 000 Zellen/cm²) wurden bei 37 °C in Serum enthaltendem (2.5 % Pferdeserum, 2.5 % Kälberserum), Hepes gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($[K^+] = 0.75 \text{ mM}$) für 120 min in Gegenwart von ³H-g-Strophanthin ($3.1 \times 10^6 \text{ cpm/Fläschchen}$; Endkonzentration $5 \times 10^{-7} \text{ M}$) inkubiert. Anschließend wurden die Zellrasen gespült (s. 2.1.3.) und in strophanthinfreiem Medium weiter inkubiert. Die Messung der Dissoziation erfolgte zu verschiedenen Zeiten ($t_{\text{Diss}} = 0 \text{ bis } t_{\text{Diss}} = 30 \text{ min}$) durch Bestimmung des dann noch an die Zellen gebundenen ³H-g-Strophanthins (cpm/Fläschchen: Δ-Δ). Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4} M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin (s. 2.1.3.3.) ermittelt (▲). Die Aktivität der Na⁺-Pumpe konnte ebenfalls nach einer Vorinkubation von 120 min in $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ g-Strophanthin und anschließender Weiterinkubation in glykosidfreiem Medium durch Messung der ⁸⁶Rb⁺-Aufnahme in die Zellen (Zugabe von 50 μl ⁸⁶RbCl für 1 min, danach Stoppen des Aufnahmeprozesses (s. 2.1.4.); eingesetzte Radioaktivität: $5.4 \times 10^4 \text{ cpm } ^{86}\text{Rb}^+$) zu verschiedenen Zeiten ($t = 0 \text{ bis } t = 30 \text{ min}$) bestimmt werden. Die erhaltenen Werte (cpm/Fläschchen) wurden gegen die Zeit aufgetragen (O—O). Die maximale Hemmung der Na⁺-Pumpe durch 10^{-4} M g-Strophanthin ergab einen Wert von 280 cpm/Kulturfläschchen (●).

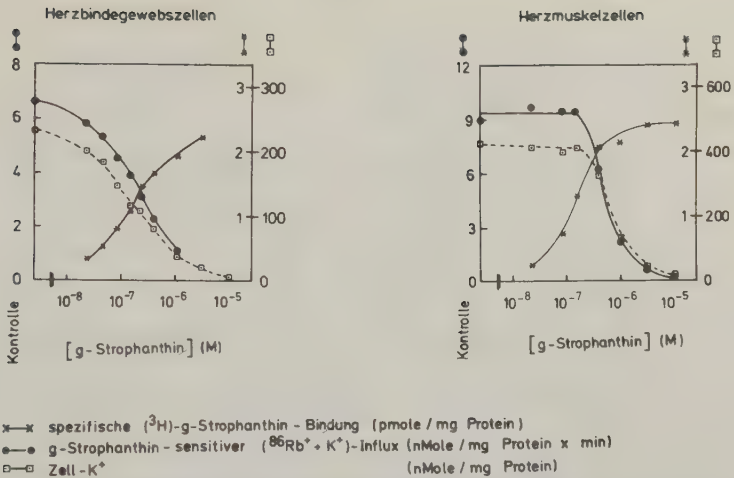


Abbildung 15: Korrelation von Herzglykosid-Bindung, Hemmung der Na^+ -Pumpe und Abnahme des intrazellulären K^+ -Gehaltes in kultivierten Hühnerherzzellen

Die spezifische, konzentrationsabhängige ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurde - wie in Abb. 3 a und 3 b gezeigt - gemessen und nach Scatchard (239) ausgewertet. Gleichzeitig wurde die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und der intrazelluläre K^+ -Gehalt bei verschiedenen Konzentrationen von g-Strophanthin bei 37°C bestimmt.

Herzbindegewebszellen: Eingesetzte Radioaktivität: 1.38×10^6 cpm ($^{86}\text{Rb}^+$) und $0.96 - 3.83 \times 10^6$ cpm (^3H -g-Strophanthin); Zellprotein/Fläschchen: 0.25 mg. Die Auswertung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung ergab: $K_D = 1.4 \times 10^{-7}\text{M}$; $B_{\text{max}} = 2.3$ pmol/mg Protein. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte von $n = 3$ (für die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und ^3H -g-Strophanthin-Bindung) und $n = 6$ (für den intrazellulären K^+ -Gehalt).

Herzmuskelzellen: Aussaatdichte: 80 000 Zellen/cm 2 ; eingesetzte Radioaktivität: 2.45×10^6 cpm ($^{86}\text{Rb}^+$) und $(0.96 - 3.83) \times 10^6$ cpm (^3H -g-Strophanthin); Zellprotein/Fläschchen: 1.16 mg. Die Auswertung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung ergab: $K_D = 2.0 \times 10^{-7}\text{M}$; $B_{\text{max}} = 2.7$ pmol/mg Protein. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte von $n = 2$ (für die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme), $n = 3$ (für die ^3H -g-Strophanthin-Bindung) und $n = 5$ (für den intrazellulären K^+ -Gehalt).

Gesamtinkubationsvolumen: 4.1 ml/Fläschchen; $[\text{K}^+] = 0.75$ mM; die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-2}M g-Strophanthin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen. Zur Ermittlung des strophanthinsensitiven K^+ -Gehaltes und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes wurde das Zellkalium und die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate in Gegenwart von 10^{-2}M g-Strophanthin gemessen und als unspezifisch von den bei den gewählten g-Strophanthin-Konzentrationen ermittelten Meßwerten für Zellkalium und Kationen-transport abgezogen. Bei 10^{-2}M g-Strophanthin ergab sich für **Muskelzellen:** Zellkalium = 10 nmol/mg Protein; ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme = 0.35 nmol/mg Protein x min und für **Bindegewebszellen:** Zellkalium = 10 nmol/mg Protein; ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme = 1.21 nmol/mg Protein x min.

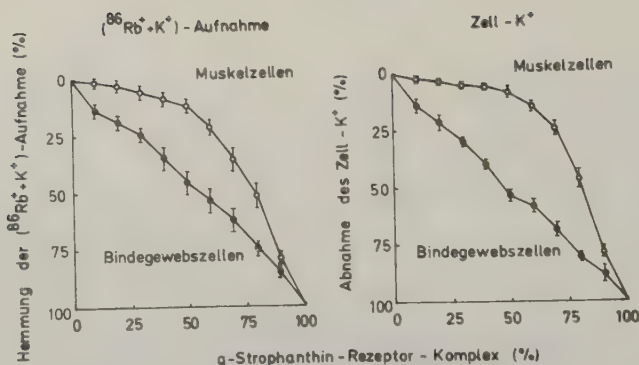


Abbildung 16: Korrelation von g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der Na^+ -Pumpe in Muskel- und Bindegewebszellen des Hühnerherzens

Aus mehreren Experimenten entsprechend der Abb. 17 wurden nach dem Massenwirkungsgesetz diejenigen Konzentrationen an g-Strophanthin errechnet, die zu einer 10, 20, 30 ... 90 %igen Besetzung der spezifischen Glykosidbindungsstellen mit g-Strophanthin führen. Die Berechnung erfolgte dabei unter der Annahme, daß eine g-Strophanthin-Bindungsstelle ein Molekül g-Strophanthin bindet. Für die so ermittelten g-Strophanthin-Konzentrationen wurden dann - wie in Abb. 17 gezeigt - aus den im selben Experiment aufgestellten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen die jeweils zugehörigen Werte der strophanthinsensitiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und des zellulären K^+ -Gehaltes graphisch ermittelt.

Abb. 16 zeigt die Auftragung dieser jetzt in Prozent des Kontrollwertes ohne g-Strophanthin ausgedrückten Daten für die Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme bzw. die Abnahme des Zellkaliums (Ordinate) gegen die Anzahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexe (in % der maximalen Bindung, B_{max}).

Die angegebenen Daten basieren auf 9 Einzelexperimenten (Herzmuskelzellen) und 5 Einzelexperimenten (Herzbindegewebszellen) mit jeweils Dreifachbestimmungen und stellen Mittelwerte - SEM dar (nähere Erläuterung s. Text).

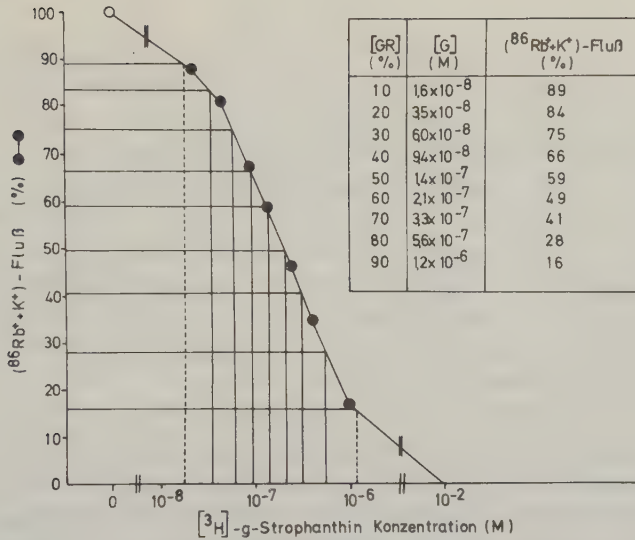


Abbildung 17: Graphische Bestimmung der prozentualen Hemmung der (⁸⁶Rb⁺ + K⁺)-Aufnahme und Abnahme des intrazellulären K⁺-Gehaltes bei zunehmender (10, 20, ... 90 prozentiger) Besetzung der g-Strophanthin-Bindungsstellen

Die graphische Bestimmung der in Abb. 16 verwendeten Daten wird an Hand des in Abb. 15 gezeigten Experiments mit Hühnerherz-Bindegewebszellen erläutert: Durch Messung der konzentrationsabhängigen Bindung von ³H-g-Strophanthin und Auswertung nach Scatchard (239) hatte sich für die untersuchten Zellkulturen eine K_D von 1.4 × 10⁻⁷ M und eine B_{max} von 2.3 pmol/mg Protein ergeben (Einzelheiten s. Legende der Abb. 15). Diese Daten wurden in die Massenwirkungsgleichung K_D = S × R/SR eingesetzt (s. Text). Aus dieser Gleichung kann nun diejenige g-Strophanthin-Konzentration berechnet werden, die zu einer bestimmten (z. B. 10, 20, ... 90 %igen) Rezeptorbesetzung führt. Für die obengenannten Daten (K_D, B_{max}) errechnet sich eine 10 %ige Rezeptorbesetzung für eine g-Strophanthin-Konzentration von 1.6 × 10⁻⁸ M, eine 20 %ige Besetzung bei 3.5 × 10⁻⁸ M ... und eine 90 %ige Besetzung bei 1.2 × 10⁻⁶ M. Für genau diese Konzentrationen wurden in Abb. 16 die zugehörigen Werte der (⁸⁶Rb⁺ + K⁺)-Aufnahme (●—●; ausgedrückt in Prozent der Kontrolle ohne g-Strophanthin) graphisch bestimmt. So sind beispielsweise bei einer 10 %igen Rezeptorbesetzung (≅ 1.6 × 10⁻⁸ M g-Strophanthin) 11 % der (⁸⁶Rb⁺ + K⁺)-Aufnahme gehemmt usw.

Sämtliche der in Abb. 16 zusammengefaßten Experimente wurden auf diese Weise identisch ausgewertet.

für den strophanthinempfindlichen ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transport und den intrazellulären K^+ -Gehalt (jeweils in Prozent des Kontrollwertes ohne g-Strophanthin) ermittelt werden. Dies ist am Beispiel der Bindegewebszellen in Abb. 17 nochmals gezeigt. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß 10 % der Bindungsstellen für g-Strophanthin bei einer Konzentration von $1.6 \times 10^{-8}\text{M}$ besetzt sind, was zu einer Abnahme des aktiven Kationentransportes von 100 % (Ausgangswert) auf 89 % führt. Entsprechend führt eine g-Strophanthin-Konzentration von $3.5 \times 10^{-8}\text{M}$ zu einer 20 %igen Besetzung der Bindungsstellen und zu einer Hemmung des Kationentransportes auf 84 % des Kontrollwertes.

Das Ergebnis mehrerer derartiger Korrelationen ist in Abb. 16 für Herzmuskelzellen ($n = 9$) und Herzbindegewebszellen ($n = 5$) dargestellt: In Herzmuskelzellen führt eine bis 40 %ige Besetzung der Herzglykosid-Bindungsstellen mit g-Strophanthin nur zu einer geringgradigen, kleiner als 10 %igen Hemmung der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme. Erst eine darüber hinausgehende Bindung hemmt dann die Na^+ -Pumpe im erwarteten Ausmaß. Dies wird noch deutlicher, wenn man das Verhalten des intrazellulären K^+ -Gehaltes betrachtet, wo eine 50 %ige Besetzung der Bindungsstellen nötig ist, um ein Absinken des intrazellulären K^+ -Gehaltes um 10 % zu bewirken.

Im Gegensatz dazu ist in Hühnerherz-Bindegewebszellen eine strenge 1:1 - Kopplung von Bindung und Hemmung des aktiven Kationentransportes über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich nachweisbar. Auch der intrazelluläre K^+ -Gehalt sinkt mit steigender Besetzung der g-Strophanthin-Bindungsstellen linear ab (Abb. 16), wobei bereits eine geringgradige Bindung von 10 % einen meßbaren Effekt hat.

4. DISKUSSION

4.1. Existiert ein spezifischer Herzglykosid-Rezeptor in Hühnerherzzellen in Kultur?

Die in den Jahren 1967 und 1968 mit radioaktiv markiertem Digoxin (^3H -Digoxin) an Zellmembranen des Rinderherzens durchgeführten Studien von Matsui und Schwartz erbrachten den ersten biochemischen Nachweis von Pharmakon- bzw. Hormonrezeptoren überhaupt (201, 202). Eine Reihe von Untersuchungen mit dem Herzglykosid g-Strophanthin (^3H -g-Strophanthin) folgten (Überblick bei 82). Ähnlich wie bei anderen in den darauffolgenden Jahren entdeckten Rezeptoren (β -Sympathomimetika, Opiate, Insulin, Glukagon, Azetylcholin, Progesteron, Neurotransmitter, Histamin, Trijodthyronin; Überblick bei 76, 82), so beruht auch die Identifizierung einer Bindungsstelle für Digitalis immer auf dem Nachweis einer spezifischen Bindung des verwendeten Radioliganden (in diesem Fall ^3H -g-Strophanthin, ^3H -g-Digoxin, ^3H -Methyl-Digoxin) an ein komplementäres Bindungsprotein. Für die Ausbildung des Glykosid-Rezeptor-Komplexes wurden dabei unter Zugrundelegung der bekannten Literatur folgende charakteristische Eigenschaften gefordert: Der Bindungsvorgang soll sättigbar, reversibel und durch Kalium hemmbar sein sowie mit hoher Affinität ablaufen, die Bindungsstelle selbst soll selektiv für Herzglykoside sein (7, 82).

Das Zutreffen der genannten Kriterien allein berechtigt allerdings noch nicht dazu, von einer Bindungsstelle als einem Rezeptor zu sprechen, da die Glykosidbindung nur den ersten Schritt in einer Kette von - z. T. noch unbekannten Ereignissen - darstellt. Erst wenn an deren Ende ein meßbarer, mit der Pharmakonbindung korrelierbarer Effekt steht, kann die Existenz eines spezifischen Rezeptors als sicher gelten (82, 259). Für die Untersuchung des Herzglykosid-Rezeptors bedeutet dies, daß je nach verwendetem experimentellen Modell die Bindung des Glykosids an seinen Rezeptor entweder zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (meßbar in intakten Muskelpräparaten, eingeschränkt in Herzmuskel-Zellkulturen) oder zu einer

Hemmung des aktiven Kationentransportes (meßbar in Herzmuskelzellen, weniger exakt in intakten Muskelpräparaten) oder zu einer Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität (meßbar in Zellmembranpräparationen) oder zu anderen, bisher nicht bekannten Effekten führen sollte.

In der Tat konnten Herzglykosid-Rezeptoren mit den genannten Eigenschaften in den Herzen und auch in anderen Organen vieler Tierspezies identifiziert werden (Überblick bei 246). Als Untersuchungsmaterial dienten dabei in vielen Fällen mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase angereicherte Zellemembranen des Herzens und intakte Muskelpräparate (70, 71, 72, 73, 275). Hühnerherzzellen in Kultur wurden zwar mehrfach zur Bestimmung ihrer Glykosidaffinität und der maximalen Zahl von Herzglykosid-Bindungsstellen verwendet (s. a. Tab. 5). Eine umfassende Darstellung ihrer Glykosid-Bindungseigenschaften fehlt jedoch bisher.

Im folgenden soll daher zunächst diskutiert werden, ob Hühnerherz-Muskelzellen und Hühnerherz-Bindegewebszellen überhaupt einen Glykosidrezeptor besitzen, der die obengenannten Kriterien erfüllt, oder ob sogar mehrere Arten von Rezeptoren vorliegen. Die Klärung dieser grundsätzlichen Fragen stellt die Ausgangsbasis für weiterführende Studien des Glykosid-Wirkungsmechanismus an der isolierten Herzzelle des Hühnchens dar.

4.1.1. Charakterisierung der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Hühnerherzzellen

4.1.1.1. Bindungskinetik

Die Bindung des Herzglykosids g-Strophanthin an seine Bindungsstelle auf der Hühnerherz-Muskelzellmembran ist ein sättigbarer und im Minutenbereich reversibler Vorgang (Abb. 1, 2, 5 und Text zu den Abb.). Der Prozeß der Assoziation kann dabei durch eine Reaktionsgleichung 2. Ordnung, die Dissoziation durch eine Reaktionsgleichung 1. Ordnung beschrieben werden (Abb. 5 c/ 5 d).

Während Einvernehmen darüber besteht, daß sich der g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex bei 37 °C in Kulturen von intakten Herzmuskelzellen (104, 203, 289) und HeLa-Zellen bzw. Girardi-Zellen (28) als auch in Membranpräparationen des Herzens (12, 80, 157) mit Halbwertszeiten von Minuten bildet, existieren stark differierende Befunde bezüglich der Reversibilität der Glykosidbindung. So berichten Okita und Mitarbeiter, daß die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ durch Glykoside am isolierten, perfundierten Kaninchenherzen nach Auswaschen mit einer Reaktivierungs-Halbwertszeit von 6 Stunden praktisch irreversibel ist (219). Da jedoch der g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex in Enzympräparationen des Meerschweinchenherzens bei einer Temperatur von 27 °C innerhalb weniger Minuten dissoziiert (5, 269), wurde als Erklärungsmöglichkeit eine unterschiedliche Stabilität von in vitro gebildeten und im schlagenden Herzen gebildeten Komplexen vorgeschlagen (220).

Gegen diese Hypothese sprechen Untersuchungen anderer Autoren, die am isolierten, schlagenden Herzen des Meerschweinchens (165) und Kaninchens (245) nachweisen konnten, daß sowohl die Bindung von Herzglykosiden als auch die resultierende Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ und der Na^+ -Pumpe reversibel sind. Nicht nur am intakten Muskelpräparat, sondern auch am Versuchsmodell der Zellkultur existieren diesbezüglich kontroverse Versuchsergebnisse. So wird für HeLa-Zellen von einer Dissoziations-Halbwertszeit nach ^3H -g-Strophanthin-Bindung von 20.9 Stunden (28), aber auch von 30 Minuten (19) berichtet. Die entsprechenden Daten für Rattenherz-Muskelzellen reichen von wenigen Minuten (289) über ca. 1 Stunde (104) bis zu 11 Stunden (203). Für Hühnerherz-Muskelzellen und Hühnerskelett-Muskelzellen in Kultur wurden kürzlich in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen Halbwertszeiten für Assoziation und Dissoziation von jeweils 1 - 3 Minuten beschrieben (157, 273). Dieser Befund korreliert dabei zeitlich gut mit dem Auftreten bzw. Verschwinden eines positiv inotropen Effektes in diesen Zellen (24, 285) und der schnellen Reaktivierung der durch g-Strophanthin gehemmten Na^+ -Pumpe nach Inkubation in glykosidfreiem Medium (256, eigene Befunde s. 3.2.2.).

Eine Erklärung für die widersprüchlichen Angaben zur Dissoziationskinetik von g-Strophanthin in den verschiedenen Zellkulturpräparationen kann gegenwärtig nicht gegeben werden. Eine Gegenüberstellung der g-Strophanthin-Dissoziationskinetiken in verschiedenen Spezies muß allerdings immer berücksichtigen, daß die Halbwertszeiten hierfür sehr stark von der jeweiligen Dissoziationskonstanten K_D und damit von der Glykosidempfindlichkeit der einzelnen Spezies abhängen. Dabei führt eine hochaffine K_D (z. B. Mensch, Schaf, Rind) zu langen Dissoziations-Halbwertszeiten und umgekehrt (Überblick bei 82). Halbwertszeiten von mehreren Stunden, wie sie oben beschrieben wurden, sind jedoch damit - zumal bei der digitalisinsensitiven Spezies Ratte - keinesfalls zu erklären. Möglicherweise liegen in diesen Fällen langsamer Dissoziation (28, 203) auch Artefakte in Form einer Internalisation von g-Strophanthin vor, wie sie bei HeLa-Zellen gefunden wurde (52, 173). Solche Fehlermöglichkeiten konnten von uns für Hühnerherzzellen weitgehend ausgeschlossen werden. (s. 4.1.1.6. und 4.1.1.7.). Zumindest im Hühnermyokard ist durch die vorgelegten Daten die g-Strophanthin-Bindung an seine Bindungsstelle eindeutig als monophasischer, rasch verlaufender und schnell reversibler Vorgang charakterisiert und erfüllt diesbezüglich die unter 4.1. beschriebenen Kriterien der Glykosid-Rezeptor-Bindung. Die Tatsache, daß die Assoziations- und Dissoziationsreaktion der g-Strophanthin-Bindung mit einer homogenen Reaktionskinetik 2. bzw. 1. Ordnung vereinbar ist, weist darauf hin, daß das Glykosid im Hühnermyokard nur an eine Art von spezifischer Bindungsstelle bindet.

4.1.1.2. Affinität von g-Strophanthin zur Bindungsstelle

Die bisher für Studien zum Wirkungsmechanismus der Herzglykoside eingesetzten Tierspezies unterscheiden sich z. T. beträchtlich in ihrer Sensitivität gegenüber dieser Pharmakongruppe (Überblick bei 82). Meßparameter für die Glykosidempfindlichkeit sind dabei entweder das Auftreten von positiv inotropen (oder toxischen) Effekten in vivo oder die Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase bzw. des aktiven Kationentransportes in

vitro (82, 231). Auch die Dissoziationskonstante K_D des Glykosid-Rezeptor-Komplexes - ermittelt über die konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin unter Gleichgewichtsbedingungen oder durch die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten des Glykosid-Rezeptor-Komplexes in vitro (s. 2.1.3.) - liefert ein gutes Maß für die Sensitivität einer Tierspezies in vivo (30, 82). Je höher die K_D , desto geringer ist die Affinität des Glykosids zu seiner Bindungsstelle und desto geringer ist auch die jeweilige Glykosidempfindlichkeit der betreffenden Spezies.

Eine Vielzahl von Spezies einschließlich des Menschen wurde bereits auf ihre Glykosidempfindlichkeit nach den genannten Parametern überprüft. Demnach rechnet man Katze, Hund, Schaf, Rind, Frosch sowie den Menschen mit Dissoziationskonstanten von ca. 10^{-8} - 10^{-9} M zu den digitalissensitiven, Tiere wie Meerschweinchen und Ratte mit Dissoziationskonstanten von 10^{-6} - 10^{-7} M zu den digitalisinsensitiven Spezies (Überblick bei 82). Während die Assoziationsraten in beiden Gruppen fast identisch sind (im Bereich von $1.1 - 1.9 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), erklären deutliche Unterschiede in den Dissoziationsraten ($0.6 \times 10^{-2}\text{sec}^{-1}$ bei der Ratte gegenüber 10^{-5}sec^{-1} beim Frosch) gut die unterschiedliche Digitalisempfindlichkeit.

Die Untersuchung der Affinität von Glykosid-Bindungsstelle und g-Strophanthin in Hühnerherzzellen ergab eine Assoziationsrate von $3.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ($2.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) und eine Dissoziationsrate von $4.5 \times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$ ($2.8 \times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$) für Muskelzellen (Bindegewebszellen), woraus sich die Dissoziationskonstante zu $k_{-1}/k_{+1} = 1.9 \times 10^{-7}\text{M}$ ($1.3 \times 10^{-7}\text{M}$) errechnet (s. a. Tab. 3). Über die Messung der konzentrationsabhängigen Bindung von g-Strophanthin unter Gleichgewichtsbedingungen erhält man mit einer K_D von $1.5 \times 10^{-7}\text{M}$ ($1.9 \times 10^{-7}\text{M}$) praktisch identische Werte (s. a. Tab. 2). In Übereinstimmung damit traten die halbmaximalen glykosidspezifischen Wirkungen wie Hemmung des aktiven Kationentransportes, Absinken des intrazellulären K^+ -Gehaltes und positive Inotropie ebenfalls in den genannten Konzentrationsbereichen auf (Tab. 2; 4.1.2.2.).

Dies bedeutet, daß das Hühnermyokard eine deutlich geringere Affinität zu g-Strophanthin und auch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber diesem Pharmakon aufweist als beispielsweise der hochempfindliche menschliche Herzmuskel ($K_D = \text{ca. } 10^{-9}\text{M}$). Auch von Smith und Mitarbeitern durchgeführte Bindungsstudien (257) an der intakten, kultivierten Hühnerherz-Muskelzelle ($K_D = 1.3 \times 10^{-7}\text{M}$) sowie eigene Untersuchungen an Muskelzell-Membranpräparationen des Hühnerherzens ($K_D = 4.3 \times 10^{-7}\text{M}$; Abb. 4 b) bestätigen diese Einordnung. Andere Autoren berichten allerdings über eine bis zu 25fach geringere Digitalisempfindlichkeit von Hühnerherz-Muskelzellen (3, 114), ohne daß diese Diskrepanz befriedigend erklärt werden kann (s. a. 4.1.2.2.). In jedem Fall kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die in der vorliegenden Untersuchung beschriebene Herzglykosid-Bindungsstelle eine Affinität für g-Strophanthin aufweist, wie sie auch für spezifische Herzglykosid-Rezeptoren in den anderen bisher untersuchten Spezies gefunden wurde. Dies muß als weiterer Hinweis dafür gesehen werden, daß es sich bei der Bindung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen in Kultur ebenfalls um die Bindung an einen spezifischen Herzglykosid-Rezeptor handelt.

4.1.1.3. Kalium-Abhängigkeit der Bindung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen

Seit langem ist bekannt, daß Hyper- und Hypokaliämie die klinische Wirksamkeit von Herzglykosiden durch Interaktionen mit ihrem Rezeptor beeinflussen können (75) und entweder zur Wirkungsabschwächung bzw. zum Wirkungsverlust (Hyperkaliämie) oder zur Wirkungsverstärkung im Sinne von Intoxikationen (Hypokaliämie) führen können.

Die Beziehung von K^+ , Herzglykosiden und Herzglykosid-Rezeptor konnte unter experimentellen Bedingungen am Tier näher abgeklärt werden. So wurde an verschiedenen Versuchsmodellen festgestellt (Meerschweinchen-Vorhof, 118; isolierte Säuger tierzellen, 17; menschliche Herzzellmembranen, 75; HeLa-Zellen, 19; glatte Muskulatur, 39; Rattenherz-Muskelzellen, 203; Erythrozyten, 108), daß Kalium sowohl die Bindung von g-Strophanthin als auch dessen inhibitorische Wirkung auf die

($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase bzw. das Auftreten von positiv inotropen Effekten hemmt (vgl. auch 11).

Auch in den in Kapitel 3.1.5.1. (Abb. 8) gezeigten Versuchen an Hühnerherzzellen in Kultur konnte eine deutliche Hemmung der Bindung von g-Strophanthin an seine Bindungsstelle bei steigenden Kaliumkonzentration nachgewiesen werden. Hierfür kommen mehrere Ursachen in Betracht: Zum einen könnte eine Erhöhung des Kaliumgehaltes im Inkubationsmedium zu einer Verminderung des absoluten Gehaltes an freiem, für das Herzglykosid-Molekül zugänglichen Rezeptoren (z. B. durch Konformationsänderung des Bindungsproteins) und damit zu einer Verminderung der maximalen Herzglykosid-Bindungskapazität je Proteineinheit führen. Zum anderen wäre eine durch Kaliumionen bedingte Veränderung der Affinität zwischen dem Herzglykosid-Molekül und seinem Rezeptor möglich. Dies hätte eine Änderung der Dissoziationskonstanten K_D zur Folge. Schließlich ist eine Kombination der beschriebenen Mechanismen denkbar.

Nähere Untersuchungen des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus zeigten in Übereinstimmung mit anderen Autoren (12, 48, 106, 188) und im Gegensatz zu den von Deth u. Mitarbeitern an der glatten Gefäßmuskulatur erhobenen Befunden (62), daß die maximale Bindungskapazität der Bindungsstellen für g-Strophanthin durch Kalium nicht verändert wird, die Dissoziationskonstante K_D jedoch deutlich ansteigt (s. 3.1.5.2., Abb. 9/10). Kinetische Untersuchungen ergaben, daß die Affinitätsminderung von Glykosid und Bindungsstelle durch Kalium (ersichtlich an der gestiegenen K_D) praktisch ausschließlich auf eine verlangsamte Assoziationsreaktion zurückzuführen ist, während die Dissoziation des Glykosids von seiner Bindungsstelle durch Kalium nicht beeinflusst wird (s. 3.1.5.3., Abb. 11). Dieses Phänomen wurde erstmals von Erdmann u. Mit. beschrieben (75, 82) und ist inzwischen mehrfach bestätigt worden (19, 106, 175, 244). Als mögliche Erklärung wird eine durch Kaliumionen bedingte Konformationsänderung des Rezeptorenzyms angeführt, die den Rezeptor für das Glykosidmolekül schlechter zugänglich machen soll, ohne jedoch die Dissoziation des einmal gebundenen Liganden zu behindern (149).

Eine derartige Hemmung der g-Strophanthin-Bindung durch steigende Konzentrationen von Kalium, wie sie von uns an der intakten Hühnerherzzelle festgestellt wurde, ist bereits für viele eindeutig als Glykosidrezeptoren identifizierte Bindungsstellen für g-Strophanthin beschrieben. Dies kann als weiterer Hinweis dafür aufgefaßt werden, daß auch in der intakten Hühnerherzzelle höchstwahrscheinlich ein Glykosidrezeptor und nicht ein wie auch immer gearteter Bindungsartefakt vorliegt.

4.1.1.4. Selektivität der g-Strophanthin Bindungsstelle für Herzglykoside

Ein weiteres Kriterium für das Vorliegen eines Rezeptors ist der Nachweis der Selektivität der gefundenen Bindungsstelle gegenüber dem jeweiligen Liganden. Für den geforderten Herzglykosid-Rezeptor an Hühnerherzzellen bedeutet dies, daß hier nur Digitalisglykoside (g-Strophanthin, Digoxin, Digitoxin) mit hoher Affinität binden sollten und eine kompetitive Verdrängung eines Glykosidmoleküls aus der Bindung nur durch ein Pharmakon der gleichen Stoffklasse, nicht jedoch durch gruppenfremde Substanzen möglich sein sollte (82).

Dies trifft für die in Hühnerherzzellen gefundene Bindungsstelle zu. So konnte durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die Bindung von radioaktiv markiertem g-Strophanthin an Hühnerherz-Muskelzellen durch im Überschuß vorhandenes, nicht radioaktiv markiertes g-Strophanthin, Digoxin und Digitoxin mit etwa der gleichen Wirksamkeit gehemmt wird (285). Andere Steroidmoleküle ohne charakteristische Herzglykosidkonfiguration - wie z. B. Dexamethason - verdrängen ³H-g-Strophanthin ebensowenig wie Substanzen mit hoher Affinität zum β -adrenergen Rezeptor (z. B. Propranolol, 285).

4.1.1.5. Zahl der spezifischen Herzglykosid-Bindungsstellen

Die Zahl der Herzglykosid-Bindungsstellen wurde bisher in Zellen einer Vielzahl von Organen und Spezies bestimmt. Eine Zusammenfassung der verfügbaren Daten gibt Tabelle 5.

Normalerweise finden sich zwischen 10 000 und 1 000 000 Herzglykosid-Rezeptoren pro Zelle. Eine Ausnahmestellung nimmt hierbei nur der Erythrozyt ein, der, je nach Spezies und Präparationsmethode, mit 200 - 4 500 Rezeptoren (vgl. Tab. 5) eine deutlich geringere Dichte aufweist. Die geringe Anzahl an Rezeptoren und damit an aktiven ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Molekülen wird mit der unter physiologischen Bedingungen äußerst geringen passiven Permeabilität der Erythrozytenmembran gegenüber Kationen erklärt (19). Proliferierende Epithelzellen, kontrahierende Herzzellen oder leitende Nervenzellen benötigen demgegenüber wesentlich mehr Pumpmoleküle, um die Kationendifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufrechtzuerhalten oder - z. B. nach einer Depolarisation - wieder aufzubauen.

In den eigenen Untersuchungen wurde in Hühnerherz-Muskelzellen eine Rezeptorenzahl von 860 000/Zelle und von 300 000/Zelle in Bindegewebszellen gefunden (s. 3.1.7.). Diese Daten stimmen in ihrer Größenordnung sehr gut mit den in Tab. 5 gegebenen Werten überein. Insbesondere kommen von anderen Gruppen durchgeführte Studien an Myokardzellen des Hundes (740 000/Zelle; 222), der Ratte (150 000 - 1.6 Mill.; 104, 203, 289) und des Huhnes (540 000 - 1.4 Mill.; 3, 157) auch unter Berücksichtigung eines eventuell vorhandenen Zwei-Rezeptorensystems (104, 157, 289) zu vergleichbaren Ergebnissen. Wesentlich höhere Rezeptorenzahlen sind jedoch für das Kaninchenmyokard beschrieben (8.5 Mill.; 65), ohne daß diese Diskrepanz befriedigend erklärt werden kann.

Bei derartigen Vergleichen muß jedoch immer berücksichtigt werden, daß die obengenannten Zahlen von den einzelnen Arbeitsgruppen auf dem Boden eines stark unterschiedlichen

Verhältnisses von Zellzahl zu Protein ($0.7 - 15.5 \times 10^6$ Zellen/mg für Muskelzellen; $0.8 - 41.6 \times 10^6$ Zellen/mg für Bindegewebszellen; 104, 186, 215, 222, 226, 252, 281, 284) errechnet wurden und somit nur als Schätzwerte anzusehen sind. Hinzu kommt, daß die einzelne Zelle abhängig von Art, Spezies und Kultivierungsbedingungen (dicht/dünn, Monolayer, Suspension) verschieden groß sein kann (28) und dementsprechend signifikante Unterschiede in der für die ^3H -g-Strophanthin-Bindung je Zelle zur Verfügung stehenden Membranoberfläche bestehen (28, 170, 171). Das Verhältnis von Bindungsstellen pro Zelle bietet in diesem Fall kein verlässliches und vergleichbares Maß für die Rezeptorendichte auf der Zellmembran. Es wurde daher der Versuch unternommen, die Zellmembranoberfläche und das Zellvolumen verschiedener Zellarten auszumessen und die spezifische Glykosidbindung auf die Einheit μm^2 Membranoberfläche zu beziehen. Tabelle 4 zeigt die von verschiedenen Autoren gefundenen Werte für das Zellvolumen und die Zellmembranoberfläche. Unter Verwendung dieser Daten ergibt sich für Hühnerherzzellen eine Rezeptorendichte von $430/\mu\text{m}^2$ (Muskelzellen) und $300/\mu\text{m}^2$ (Bindegewebszellen). Dies sind ähnliche Werte, wie sie auch schon an Ventrikelstreifen und Papillarmuskeln des Menschen ($1000/\mu\text{m}^2$; 76), der Ratte ($660/\mu\text{m}^2$; 80) und der Katze ($760/\mu\text{m}^2$; 209) sowie an der Skelettmuskulatur des Frosches ($656/\mu\text{m}^2$; 195) gefunden wurden.

4.1.1.6. Sind Artefakte durch Internalisierung von ^3H -g-Strophanthin in der intakten Hühnerherzzelle auszuschließen?

Der spezifische Rezeptor für Herzglykoside ist auf der äußeren Seite der Zellmembran lokalisiert (41, 140, 223, 224). Bei der Untersuchung und quantitativen Charakterisierung dieses Rezeptors an der intakten Zelle muß daher im Gegensatz zu isolierten Membranpräparationen mit ihrer aufgehobenen Zellintegrität ausgeschlossen werden, daß signifikante Mengen des verwendeten Radioliganden nicht spezifisch gebunden, sondern auf irgendeine Weise in das Zellinnere aufgenommen ("internalisiert")

Tabelle 4: Volumen, Oberfläche und Proteingehalt von Zellen verschiedener Spezies in Kultur - Literaturübersicht

SPEZIES	ZELLART	VOLUMEN $\mu\text{m}^3/\text{Zelle}$	OBERFLÄCHE $\mu\text{m}^2/\text{Zelle}$	PROTEIN- GEHALT pg/Zelle	LITERATUR
Mensch	Girardi-Z.	2240	1590		Lamb u. McCall 1972 (171)
			730*		Boardman et al. 1972 (28)
	HeLa-Z.	3080	2110		Lamb u. McCall 1972 (171)
Ratte	Erythrozyt	87	163	190 + 9	Boardman et al. 1974 (29)
	Herzmuskel-Z.	3000	5000	1500	Furukawa et al. 1979 (107)
		2560	2350		Simpson et al. 1982 (252)
					McCall 1979 (203)
				100	Lewis u. Harary 1971 (186)
Meerschweinchen	Endothel-Z.			100	Porzig et al. 1982 (226)
	Epithel-Z.	1200	540*	640	Werdan et al. 1980 (281)
		3500	3200 - 3600	120	Nees et al. 1981 (215)
	Herzmuskel-Z.	1440	1460		Lamb u. McKinnon 1971 (170)
					Burrows u. Lamb 1962 (39)
Hund	Fibroblasten			550	Werdan et al. 1983 (284)
	Herzmuskel-Z.			200	Kazazoglou et al. 1983 (157)
	Herzmuskel-Z.			240	Werdan et al. 1983 (284)
	HeLa-Z.			900	Onji u. Liu 1981 (222)
	Fibroblasten			5700	Dow et al. 1981 (65)
Mensch			1000		Baker u. Willis 1970 (18)
			1020		Charlemagne et al. 1979 (45)

* Zellen in Suspension

Tabelle 5: ^3H -g-Strophanthin-Bindungsstellen in Zellkulturen verschiedener Spezies und Organsysteme - Literaturübersicht

SPEZIES	ZELLART	^3H -g-STROPHANTHIN- THIN BINDUNGS- THIN BINDUNGS- STELLEN/ZELLE STELLEN/ μm^2			LITERATUR
		1	195	1972 (28)	
Mensch	Girardi-Z.	1 900 000	1	195	Boardman et al.
		600 000	822 1)	1972 (28)	Boardman et al.
		440 000	440 1)	1972 (19)	Baker u. Willis
	HeLa-Z.	1 400 000	649	1972 (28)	Boardman et al.
		420 000	420	1972 (19)	Baker u. Willis
		750 000	355 2)	1972 (272)	Vaughan u. Cook
		790 000		1981 (3)	Aiton et al.
	Epithel-Z. Fibroblasten Erythrozyten	1 000 000	474 2)	1982 (52)	Cook et al.
		2 000 000	2 000	1979 (45)	Charlemagne et al.
		110 000	160	1979 (45)	Charlemagne et al.
Ratte	Herzmuskel-Z.	200*	1	1969 (68)	Ellory u. Keynes
		1 100**		1973 (109)	Gardner u. Kiino
		228*	1 - 2	1975 (73)	Erdmann u. Hasse
		450-500**	2 - 3	1976 (180)	Lauf u. Joiner
		260**	1 - 2	1979 (79)	Erdmann et al.
		990**	6	1980 (107)	Furukawa et al.
		200-1200*	1 - 7	1981 (82)	Erdmann
		1 600 000	720	1973 (203)	McCall
		150 000		1980 (104)	Friedman et al.
		1 000 000	425	1984 (289)	Werdan et al.
	(Na.-R.) (Ha.-R.)	80 000	33		
	Herz-Fibroblasten	33 000		1980 (104)	Friedman et al.

Meerschweinchen	Glatte Muskel-Z. (Dickdarm)	250-300	Brading u. Widdicombe	1974 (33)
	Papillarmuskel-Z.	7 500	Daut u. Rüdel	1981 (59)
Kaninchen	Herz-Z.	8 500 000	Dow et al.	1981 (65)
	Nerven-Z.	750	Landown u. Ritchie	1970 (174)
	Glatte Muskel-Z. (Aorta)	74	Deth u. Lynch	1980 (62)
Hund	Herzmuskel-Z.	740 000	Onji u. Liu	1981 (222)
Truthahn	Erythrozyten	4 500	Furukawa et al.	1980 (106)
Huhn	Herzmuskel-Z. (Na.-R.) (Ha.-R.)	540 000 1 400 000 150 000	Aiton et al. Kazazoglou et al.	1981 (3) 1984 (157)
	Herz-Fibroblasten	860 000	Werdan et al.	1984 (288)
	Skelettmuskel-Z.	300 000	Werdan et al.	1984 (288)
		2.1 pmol/mg Protein	Vigne et al.	1982 (273)

1) Zellen in Suspension

2) berechnet nach Lamb u. McCall (171)

* Erythrozyten-Membranen

** intakte Erythrozyten

Ha.-R.: Hochaffiner Rezeptor; Na.-R.: Niederaffiner Rezeptor

Zum Vergleich:	³ H-g-Strophanthin-Bindungsstellen in intakten Muskelpräparaten und Homogenaten	
Mensch	Linker Ventrikel (Homogenat)	1000
Ratte	Ventrikelstreifen	660
Katze	Papillarmuskel	760
Frosch	Skelettmuskel	656
	Erdmann	1977 (76)
	Erdmann et al.	1980 (80)
	Michael et al.	1979 (209)
	Manery et al.	1977 (195)

werden. Da unspezifisch zellgebundener und spezifisch membran-gebundener Radioligand bei der Radioaktivitätsmessung nicht mehr differenziert werden können, wären falsche Aussagen über sämtliche Bindungsparameter die unweigerliche Folge.

Die Klärung dieser Frage ist deshalb von besonderer Bedeutung, da von vielen membranaktiven Pharmaka bekannt ist, daß sie via Endocytose in das Zellinnere transportiert und dort in Phagolysosomen aufgenommen, metabolisiert und wieder ausgeschleußt werden können (z. B. α -Bungarotoxin; 291). Je lipophiler dabei das Pharmakon ist, desto größer ist seine Neigung, sich mit Komponenten der ebenfalls lipophilen Zellmembran zu verbinden. So werden z. B. Digoxin und vor allem das lipophile Digitoxin entsprechend der Höhe ihrer Konzentration in das Zellinnere aufgenommen (32, 78).

Über das Ausmaß der Internalisation des weniger lipophilen g-Strophanthins sind die Meinungen dagegen geteilt. So wird von Lüllmann u. Mit. ein Eindringen von g-Strophanthin in die Zelle als äußerst unwahrscheinlich angesehen (194). Löhr u. Mit. konnten autoradiographisch nachweisen, daß g-Strophanthin auch in hohen Konzentrationen und bei langer Einwirkdauer die Zellmembran des Meerschweinchenherzens nicht zu durchdringen vermag (190). Demgegenüber ergaben gründliche Untersuchungen an intakten, kultivierten HeLa-Zellen, daß spezifisch an seinen auf der Membran lokalisierten Rezeptor gebundenes ^3H -g-Strophanthin durch Endocytose, passive Aufnahme (60) oder im Rahmen des Membran-Turnover in das Zellinnere aufgenommen wird (52, 173, 225), wobei das Ausmaß der Internalisation stark vom Entwicklungs- und Wachstumszustand der Zellen abzuhängen scheint (172, 173). Vor allem die Tatsache, daß die Züchtung von Zellkulturen über 1 - 5 Tage in niedrigen Konzentrationen von g-Strophanthin zu einem Ansteigen des intrazellulären Glykosidgehaltes auf das 30 - 100fache der im Züchtungsmedium vorliegenden Konzentration führt (28), deutet auf eine mögliche Internalisation von g-Strophanthin hin. Ein sättigbarer, energieverbrauchender und über einen Carrier vermittelter Transport von g-Strophanthin in das Cytosol ist

allerdings nur für Leberzellen, nicht jedoch für das Myokardgewebe beschrieben (249).

Da somit noch nicht endgültig geklärt ist, ob, wann und in welchem Ausmaß es zur unspezifischen Aufnahme von g-Strophanthin in die Zelle kommt, muß diese Möglichkeit auch für das vorliegende Versuchsmodell der intakten Hühnerherzzelle in Kultur in Betracht gezogen und ausgeschlossen werden. Folgende Kriterien für eine stattfindende Internalisierung von g-Strophanthin in Zellkulturen (untersucht an HeLa-Zellen) wurden aufgestellt und müßten im positiven Fall auch in Hühnerherzzellen nachweisbar sein:

- a) Die Aufnahmekinetik für g-Strophanthin zeigt einen biphasischen Verlauf. Es kommt auch nach 50 Stunden noch zu keiner Sättigung der Bindung (52).
- b) Die Freisetzung von zellgebundenem ^3H -g-Strophanthin erfolgt sehr langsam mit einer Halbwertszeit von 20 - 70 Stunden (52, 173), während die Dissoziation des Glykosids von $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ angereicherten Zellmembranpräparationen wesentlich schneller abläuft.
- c) Während die durch 10minütige Applikation von g-Strophanthin gehemmte Na^+ -Pumpe 3 Stunden nach Inkubation der Zellen in glykosidfreiem Medium wieder ihre volle Funktion zeigt (normaler K^+ -Influx), ist die ^3H -g-Strophanthin-"Bindung" erst nach ungefähr 24 Stunden nicht mehr nachweisbar (173).

Demgegenüber kann die Glykosidbindung in kultivierten Zellen des embryonalen Hühnerherzens wie folgt beschrieben werden:

- a) Die ^3H -g-Strophanthin-Bindung zeigt monophasischen Verlauf und folgt einer Reaktionskinetik 2. Ordnung. Dies ist gleichbedeutend mit der Bindung an eine einheitliche Bindungsstelle. Eine Sättigung der spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung ist nach 30 Minuten erreicht und bleibt für mindestens 8 Stunden konstant (Abb. 1/2/5 c, Legende zu Abb. 1).

- b) Die Parameter für die spezifische ^3H -g-Strophanthin-Bindung in intakten Herzzellkulturen und in mit ATPase angereicherten Herzzellmembranen gleichen Ursprungs (embryonales Hühnerherz) sind identisch (vgl. Tab. 3, Abb. 4 und Abb. 12). Die Dissoziation des Glykosids von der intakten Muskelzelle verläuft rasch ($t_{1/2} = \text{ca. } 2.5 \text{ min}$) und weist etwa dieselbe Dissoziationsrate auf ($4.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$) wie sie auch in Zellmembranen gefunden wurde ($1.1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$).
- c) Die Besetzung der spezifischen g-Strophanthin-Bindungsstellen in Zellkulturen und Zellmembranen ist jeweils eng mit einer Hemmung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes bzw. der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität gekoppelt (Abb. 13/14/15) und führt zur positiv inotropen Wirkung an der Herzmuskelzelle (4.1.2.3.). Intrazellulär gelegenes ("internalisiertes") g-Strophanthin wäre wirkungslos (41, 114).
- d) Zellgebundenes, nicht markiertes g-Strophanthin kann innerhalb von 60 min durch ^3H -g-Strophanthin ersetzt werden (3.1.1.).

Die an Hühnerherzzellen erhobenen Befunde erfüllen keines der oben genannten Kriterien für die Internalisation von g-Strophanthin in die intakte Zelle und sprechen damit eindeutig gegen die Möglichkeit, daß es sich bei der unter unseren experimentellen Bedingungen gemessenen spezifischen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle nur um unspezifisch in die Zelle aufgenommenes Glykosid handelt. Sofern ein derartiger Prozeß in kultivierten Hühnerherzzellen überhaupt auftritt, verläuft er entweder zu langsam, um unter unseren Versuchsbedingungen erfaßt zu werden, oder er stellt einen Anteil der in allen Versuchen berücksichtigten "unspezifischen Bindung" (2.1.3.3.) dar. In keinem der beiden Fälle jedoch würde dies zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen. Eine Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Herzglykosid-Rezeptors (K_D , k_{-1} , k_{+1} , B_{max}) ist somit nicht nur in Zellmembranen (82), sondern auch in Herzzellkulturen in verlässlicher Weise möglich.

4.1.1.7. Die Bindung von ^3H -g-Strophanthin in Zellmembranpräparationen von kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen

Ein Teil der Bindungsstudien an intakten, schlagenden Hühnerherz-Muskelzellen wurde auch an daraus angefertigten, mit ATPase angereicherten Zellmembranpräparationen durchgeführt. Mit diesen Experimenten sollte nochmals ausgeschlossen werden, daß es sich bei der von uns gemessenen spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung in der intakten Zelle in Wirklichkeit um unspezifische Vorgänge im Sinne einer Internalisation von ^3H -g-Strophanthin (vgl. 4.1.1.6.) handelt. In diesem Fall wären für die maximale Bindungskapazität $B_{\max}$, die Dissoziationskonstante K_D und die Assoziations- und Dissoziationsraten k_{+1}/k_{-1} der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Zellmembranen (hier ist eine Internalisation wegen der aufgehobenen Zellintegrität nicht möglich) grundsätzlich andere Ergebnisse zu erwarten, als man sie in der intakten Zelle findet.

Der Vergleich zeigt jedoch, daß die Dissoziationskonstanten K_D der ^3H -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Herzmuskelzellen ($1.5 \times 10^{-7}\text{M}$; Tab. 3) und in deren Zellmembranpräparationen ($4.3 \times 10^{-7}\text{M}$; Abb. 4) weitgehend identisch sind. Dasselbe gilt auch für die Assoziations- und Dissoziationsraten ($k_{+1} = 3.2 \times 10^4 - 2.0 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$; $k_{-1} = 4.5 \times 10^{-3} - 1.1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$; s. Tab. 3 und Abb. 12). Linearität der Assoziations- und Dissoziationsreaktion nach Einsetzen in die Reaktionsgleichungen 2. bzw. 1. Ordnung sowie Linearität der Auftragung nach Scatchard sprechen für das Vorliegen einer spezifischen Bindungsstelle für Herzglykoside in beiden Versuchsmodellen.

Bei einer Zellmembran-Oberfläche von ca. $2000 \mu\text{m}^2/\text{Zelle}$ (203) errechnet sich dabei für Herzmuskelzellen (8.6×10^5 Glykosidbindungsstellen/Zelle) eine Dichte von 430 Bindungsstellen/ μm^2 Zellmembranoberfläche (Tab. 5). Dieser Wert stimmt mit der für Herzmuskel-Zellmembranen erhaltenen Schätzung von ca. 1000 Herzglykosid-Rezeptoren/ μm^2 Membranoberfläche (Tab. 5) gut überein.

Wie in der intakten Zelle (Abb. 11), nimmt auch in Zellmembranen die Affinität von Glykosid und Rezeptor mit steigenden Konzentrationen von Kalium auf Grund einer sinkenden Assoziationsrate bei unveränderter Dissoziationsrate stark ab (Abb. 12). Darüber hinaus hemmt g-Strophanthin konzentrationsabhängig, jedoch nicht in völlig stöchiometrischer Weise, sowohl die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität (Zellmembranen) als auch den aktiven $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Transport (intakte Zelle; Abb. 4 a/13).

Die Charakterisierung der Herzglykosid-Bindungsstelle in kultivierten Herzmuskelzellen und in Herzmuskel-Zellmembranen liefert somit bezüglich Bindungseigenschaften und Anzahl an Bindungsstellen vergleichbare Ergebnisse. Darüber hinaus erscheint eine Übertragung von Befunden an Zellmembranhomogenaten - einem in der Glykosidforschung häufig verwendeten, in mancher Hinsicht jedoch artifiziellen Versuchsmodell - auf die intakte Zelle und umgekehrt auf Grund der vorliegenden Untersuchung gerechtfertigt. Damit kann weitgehend ausgeschlossen werden, daß es bei der Charakterisierung der Glykosid-Bindungseigenschaften an der intakten Zelle mittels Radioliganden zu Artefakten, z. B. im Sinne einer Aufnahme des Radioliganden in die Zelle, und damit zu einer grundsätzlich falschen Beschreibung der auf der Außenseite der Zellmembran stattfindenden Bindungsprozesse für g-Strophanthin kommt (vgl. 4.1.1.6.).

4.1.2. Charakterisierung der Wirkung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen in Kultur

Die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und die positiv inotrope Wirkung auf Muskelzellen sind die einzigen bisher bekannten pharmakologischen Effekte von Herzglykosiden (8, 82). Neben der Messung der spezifischen Glykosidbindung mit radioaktiv markierten Liganden (3.1.) stellt die Untersuchung und Charakterisierung der oben genannten Phänomene eine unabdingbare Voraussetzung bei dem Versuch dar, eine Bindungsstelle für Herzglykoside als Rezeptor zu qualifizieren (7).

Dabei soll zunächst überprüft werden, ob die von uns an kultivierten Hühnerherzzellen über die Messung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes bestimmte Aktivität der Na^+ -Pumpe mit den für dieses Transportenzym an anderen Versuchsmodellen gefundenen Daten übereinstimmt. Anschließend werden die Wirkungen von g-Strophanthin auf die Enzymaktivität, den zellulären Elektrolytgehalt und die Kontraktilität der Herzzelle diskutiert.

4.1.2.1. Die Aktivität der Na^+ -Pumpe in kultivierten Hühnerherzzellen

Na^+ -Ionen werden im Austausch gegen K^+ -Ionen aktiv durch die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ über die Zellmembran transportiert. Bei diesem Prozeß werden pro gespaltenem Molekül ATP jeweils 3 Na^+ -Ionen aus und 2 K^+ -Ionen in die Zelle gepumpt (10, 30, 82, 116). Über die Messung der strophanthinsensitiven, aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme kann daher bei Kenntnis der insgesamt vorhandenen Na^+ -Pumpmoleküle ($\hat{=} B_{\text{max}}$) die Aktivität des einzelnen Enzymmoleküls errechnet werden.

Unter Verwendung der in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten läßt sich für jedes Na^+ -Pumpmolekül ein Transportumsatz von 50 Na^+ -Ionen/sec in Hühnerherz-Muskelzellen und von 30/sec in Hühnerherz-Bindegewebszellen errechnen ($[\text{K}^+] = 0.75 \text{ mM}$). Die Pumpaktivität des einzelnen ATPase-Moleküls liegt damit in der intakten Hühnerherzzelle - für Hühnerherz-Muskelzellen ist ein weiterer Wert von 110/sec beschrieben (3) - in derselben Größenordnung wie in menschlichen Girardi- und HeLa-Zellen (20 - 100/sec; 18, 19, 29, 169), in Nervenfasern des Kaninchens (22/sec; 174) und des Tintenfisches (67/sec; 19), in der glatten Muskulatur des Meerschweinchens (20/sec; 39) sowie in Herzzellen der neonatalen Ratte (50/sec; 203). Im Durchschnitt etwas höher liegen die entsprechenden Werte für den Erythrozyten (82 - 255/sec; 19, 67, 68, 82, 141) und für mit ATPase angereicherte Zellmembranpräparationen verschiedener Organe von Meerschweinchen (133 - 217/sec; 17), Rind (57 - 190/sec; 70) und Hund (108/sec; 175). Dieser Literaturvergleich zeigt,

daß sich die über die strophanthinsensitive aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme charakterisierte ATPase-Aktivität in Hühnerherzzellen nicht nennenswert von der Enzymaktivität in anderen Zellen und Geweben unterscheidet und die zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzten Verfahren (Messung des K^+ -Influx, Na^+ -Efflux, Menge an hydrolysiertem ATP/Zeit) vergleichbare Ergebnisse liefern.

4.1.2.2. Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase durch g-Strophanthin - Einfluß auf Zellelektrolyte

Da es nicht möglich ist, in einer Präparation von intaktem Herzgewebe, wozu auch Zellkulturen gehören, die Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase direkt zu messen (87), haben wir die strophanthinsensitive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in die Zelle bestimmt, die als verlässliches Maß für den aktiven Kationentransport und die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität angesehen werden kann (10, 295; s. a. 2.1.4.).

In Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen führt die spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin zu einer deutlichen Hemmung der Na^+ -Pumpaktivität, erkennbar an einem Absinken des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes über die Zellmembran und dem Ansteigen des intrazellulären Na^+ -Gehaltes (3.2., Abb. 13 a). Es findet sich hierbei eine gute Übereinstimmung zwischen der Konzentration an g-Strophanthin, die zu einer 50 %igen Besetzung der Bindungsstellen führt ($1.5 \times 10^{-7}\text{M}$) und der g-Strophanthin-Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung der Na^+ -Pumpe hervorruft ($\text{IC}_{50} = 5.8 \times 10^{-7}\text{M}$; Tab. 3). Noch eindeutiger wird die Korrelation von Bindung und Hemmung des Ionenflusses in Bindegewebszellen (Abb. 13 b), in denen K_D ($1.9 \times 10^{-7}\text{M}$) und IC_{50} ($2.6 \times 10^{-7}\text{M}$) praktisch identisch sind. Im Gegensatz hierzu führt die Dissoziation von spezifisch gebundenem g-Strophanthin, die in Hühnerherzzellen einer Reaktionsgleichung 1. Ordnung folgt (3.1.4.2.), zu einer spiegelbildlich verlaufenden Reaktivierung der Na^+ -Pumpe (Abb. 14), wobei die zeitlichen Abläufe für die Dissoziation, die Reaktivierung des durch g-Strophanthin inhibierten ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms und

die Normalisierung des erniedrigten Kaliumgehaltes im selben zeitlichen Bereich liegen (3.2.2.).

Zu ähnlichen Befunden gelangten Barry u. Mit., die an Hühnerherz-Muskelzellen ebenfalls zeigen konnten, daß g-Strophanthin den monovalenten Kationenfluß rasch (innerhalb von 2 min bei $10^{-6}M$) und spezifisch zu hemmen vermag. Nach Auswaschen kehrt die Na^{+} -Pumpaktivität innerhalb von Minuten auf den Ausgangswert zurück (21).

Unklarheit besteht allerdings bezüglich der absoluten Empfindlichkeit der Hühnerherz-Muskelzell-ATPase gegenüber g-Strophanthin. Während die von Biedert u. Mit. gemessene halbmaximale Hemmung der Na^{+} -Pumpe bei g-Strophanthin-Konzentrationen von ca. $4.5 \times 10^{-7}M$ auftritt (24) und damit sehr gut mit den in dieser Arbeit vorgelegten Daten übereinstimmt ($IC_{50} = 5.8 \times 10^{-7}M$; Tab. 2), verhielten sich die Zellkulturen bei anderen Untersuchern deutlich weniger digitalissensitiv.

So fanden Kazazoglou u. Mit. eine halbmaximale Hemmung des ($^{86}Rb^{+} + K^{+}$)-Flusses bei ca. $5.6 \times 10^{-6}M$ und einen halbmaximalen Anstieg der intrazellulären Na^{+} -Konzentration bei ca. $1.8 \times 10^{-6}M$ g-Strophanthin (157). Aus einer von Aiton u. Mit. erstellten Dosis-Wirkungs-Beziehung von Glykosidkonzentration und zugehöriger Pumphemmung läßt sich graphisch gut eine IC_{50} von ca. $1.5 \times 10^{-5}M$ ermitteln (3). Die Empfindlichkeit des Hühnermyokards wäre damit vergleichbar mit der Sensitivität der Ratte gegenüber Herzglykosiden: An kultivierten Herzzellen dieser bekanntermaßen relativ digitalisunempfindlichen Tierart wurde kürzlich eine halbmaximale Hemmung der Na^{+} -Pumpe durch $1.3 \times 10^{-5}M$ g-Strophanthin beschrieben (289).

Ursachen für die trotz der Verwendung identischer Versuchsmodelle (spontan schlagende Herzmuskelzellen 10 - 13 Tage alter Hühnerembryonen) z. T. stark schwankenden Befunde in der Literatur sind gegenwärtig nicht bekannt. Sicherlich spielen unterschiedliche Kaliumkonzentrationen in den jeweiligen Versuchsmedien ($0.75 mM$ in den eigenen Versuchen, $5.4 mM$ bei 3 und 157) eine Rolle, da Kalium die Empfindlichkeit der ($Na^{+} + K^{+}$)-ATPase gegenüber Digitalis senkt (3.1.5.).

Empfindlichkeitsunterschiede um den Faktor 25, wie sie hier auftreten, sind dadurch allein jedoch nicht zu erklären.

Ungeachtet der uneinheitlichen Aussagen zur Digitalissensitivität des Hühnerherzens wird von allen Autoren eine spezifische Hemmung der Na^+ -Pumpe durch g-Strophanthin beschrieben. In diesem Zusammenhang liefern die oben dargestellten eigenen Ergebnisse (halbmaximale Hemmung der Na^+ -Pumpe bei halbmaximaler Besetzung der Glykosidbindungsstellen) einen weiteren Beweis dafür, daß die Hemmung der Na^+ -Pumpe mit der Bindung von g-Strophanthin korreliert. Die enge zeitliche Korrelation von g-Strophanthin-Assoziation und Hemmung der Na^+ -Pumpe unterstützt einmal mehr die anfangs geäußerte These (4.1.), wonach die spezifische Bindung von g-Strophanthin an Herzzellen des Hühnerembryos die Bindung an einen spezifischen, mit dem $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Molekül}$ eng gekoppelten Rezeptor für Herzglykoside darstellt.

4.1.2.3. Steigerung der Kontraktilität durch g-Strophanthin

In kultivierten Herzmuskelzellen kann als Maß für die pharmakoninduzierte Steigerung der Kontraktionskraft - sie kann an Zellen nicht direkt gemessen werden - die Zunahme der Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit der Zelle verwendet werden (156, 240). Mittels verschiedener elektrooptischer Methoden (15) wurde die positiv inotrope Wirkung von Herzglykosiden auf schlagende Herzmuskelzellen bereits für mehrere Tierspezies nachgewiesen (218, 240). Auch für die embryonale Hühnerherz-Muskelzelle liegen entsprechende Untersuchungen vor (24, 94, 162, 285). Für unsere Problemstellung entscheidend ist dabei die Beantwortung der Frage, ob eine Zunahme der Kontraktionskraft von Hühnerherz-Muskelzellen in demselben Konzentrationsbereich von g-Strophanthin erfolgt, in dem es auch zu einer steigenden Besetzung der Bindungsstellen in diesen Zellen und zur zunehmenden Hemmung der Na^+ -Pumpe kommt.

Diese Frage kann eindeutig bejaht werden. So konnten Werden u. Mit. an denselben Zellkulturen, wie sie auch in der vorliegen-

den Arbeit verwendet wurden, eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die positiv inotrope Wirkung von g-Strophanthin erstellen (285). Sie fanden dabei, daß die Kontraktionskraft in Hühnerherz-Muskelzellen ab g-Strophanthin-Konzentrationen von 10^{-7} M bereits nach 2 - 3 Minuten meßbar zunimmt und bei 6×10^{-7} M ein Maximum erreicht (halbmaximaler Effekt bei 3.5×10^{-7} M). Bei höheren Glykosidkonzentrationen traten Arrhythmien auf. Zu übereinstimmenden Ergebnissen gelangten Biedert u. Mit., die ebenfalls eine mit der Hemmung der Na^+ -Pumpe korrelierende, 1 - 2 Minuten nach Zugabe des Pharmakons einsetzende Kontraktilitätszunahme von Hühnerherz-Muskelzellen im Bereich von 10^{-7} - 10^{-6} M g-Strophanthin nachweisen konnten (24).

Positiv inotroper Effekt, Besetzung der Herzglykosid-Bindungsstellen ($K_D = 1.5 \times 10^{-7}$ M; s.a. Abb. 15b) und Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase ($\text{IC}_{50} = 5.8 \times 10^{-7}$ M; s.a. Tab. 2) treten offensichtlich bei sehr ähnlichen Konzentrationen von g-Strophanthin und in zeitlich enger Korrelation auf. Dies läßt den Schluß zu, daß die Bindung von Herzglykosiden an Hühnerherzellen in Kultur unmittelbar und kausal mit einer Zunahme der Kontraktionskraft verknüpft ist und es sich daher bei der von uns an diesem Versuchsmodell charakterisierten spezifischen Bindungsstelle um einen echten Rezeptor für Herzglykoside gemäß der in Kapitel 4.1. gegebenen Definition handelt.

4.1.3. Schlußfolgerung

Die Diskussion der Untersuchungsbefunde zur g-Strophanthin-Bindung und zur g-Strophanthin-Wirkung in kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen läßt folgende Feststellungen zu:

Die g-Strophanthin-Bindung an seine spezifische Bindungsstelle in Hühnerherz-Muskelzellen ist sättigbar (4.1.1.1.), reversibel (4.1.1.1.) und durch Kalium hemmbar (4.1.1.3.). Sie läuft mit hoher Affinität ab (4.1.1.2.), ist selektiv für das Pharmakon (4.1.1.4.) und wird durch Hitzenaturierung der Membran unterdrückt (3.1.2.). Bindungsartefakte, wie sie in Form einer

Internalisierung von g-Strophanthin denkbar sind, konnten dabei sicher ausgeschlossen werden (4.1.1.6./4.1.1.7.).

Die spezifische g-Strophanthin-Bindung korreliert darüberhinaus eng mit einer Hemmung der Na^+ -Pumpe (4.1.2.2.) und einer Steigerung der Kontraktionskraft in Hühnerherz-Muskelzellen (4.1.2.3.), führt also zu zwei meßbaren pharmakologischen Effekten.

Die genannten Untersuchungsbefunde berechtigen zu der Annahme, daß es sich bei den in kultivierten Muskelzellen des embryonalen Hühnerherzens gefundenen B i n d u n g s s t e l l e n um R e z e p t o r e n für g-Strophanthin handelt, da alle für den Nachweis von Herzglykosid-Rezeptoren geforderten Kriterien (vgl. 4.1.) erfüllt sind.

4.1.4. Der Herzglykosid-Rezeptor in Hühnerherz-Bindegewebszellen

Der Herzmuskel besteht neben der kontraktilen Muskelzelle aus einer Vielzahl anderer Zelltypen (Nervenzelle, Endothelzelle, Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzelle; s.a. 1.2.). In der vorliegenden Arbeit sind sie unter dem Begriff "Bindegewebszellen" zusammengefaßt. Auf sie entfallen etwa 25 % des gesamten Zellvolumens des Herzmuskels (127, 238). Zahlenmäßig liegt ihr Anteil mit 60 - 70 % der Gesamtzellzahl des Herzens offensichtlich noch weit höher, da cytophotometrische und histologische Untersuchungen im Humanherz einen Bestand von 3×10^9 Muskelzellen gegenüber 6×10^9 Bindegewebszellen ergeben haben (2). Ein ähnliches Verhältnis findet sich auch im Myokard der Ratte (127).

Da im Mittelpunkt der Glykosidforschung die kontraktile Muskelzelle steht, jedoch eine Trennung beider Zellarten in Arbeiten mit Herzzellmembranen oder intakten Ventrikelstreifen nicht möglich ist, muß anderweitig ausgeschlossen werden, daß Bindegewebszellen die Untersuchungsergebnisse - die Charakterisierung der Bindungs- und Wirkungseigenschaften von Digitalis an der Herzmuskelzelle - verfälschen. Dies könnte zum

Beispiel beim Vorliegen verschiedener Glykosidrezeptoren in beiden Zellarten der Fall sein. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Muskelzellen und Bindegewebszellen des embryonalen Hühnerherzens getrennt kultiviert (s. METHODEN) und unabhängig voneinander die Eigenschaften des jeweiligen Herzglykosid-Rezeptors untersucht.

Ein Vergleich der erhaltenen Daten zeigt, daß Bindegewebszellen eine Bindungsstelle besitzen, die g-Strophanthin mit derselben Affinität zu binden vermag, wie dies auch für den g-Strophanthin-Rezeptor in den Muskelzellen beschrieben wurde (Abb. 3 a/3 b: $K_D = 2 \times 10^{-7} M$ in Muskelzellen; $K_D = 2 \times 10^{-7} M$ in Bindegewebszellen). Untersuchungen der g-Strophanthin-Bindung unter kinetischen und thermodynamischen Gesichtspunkten liefern identische Ergebnisse für beide Zellarten (Gegenüberstellung s. Tab. 3).

Kalium vermindert die Affinität sowohl der g-Strophanthin-Bindungsstelle (Bindegewebs-Z.) als auch des g-Strophanthin-Rezeptors (Muskel-Z.) in jeweils analoger Weise, ohne die maximale Bindungskapazität meßbar zu beeinflussen (Abb. 9/10). Wie in den Muskelzellen, so führt auch in Bindegewebszellen die Glykosidbindung zu einer deutlichen Hemmung des aktiven ($^{86}Rb^{+} + K^{+}$)-Transports, bewirkt also einen pharmakologischen Effekt (Abb. 13 b).

Zusammenfassend läßt sich daher feststellen, daß die g-Strophanthin-Bindungsstelle in der Hühnerherz-Bindegewebszelle nach den Kriterien für Herzglykosid-Rezeptoren (vgl. 4.1.) als spezifischer Rezeptor für g-Strophanthin klassifiziert werden kann. Er stimmt in seinen Eigenschaften weitgehend mit dem Rezeptor der Muskelzelle überein, so daß von der Existenz einer einheitlichen Art von Glykosidrezeptor im Hühnerherzen ausgegangen werden muß. Entsprechende Untersuchungen an kultivierten Muskel- und Bindegewebszellen des neonatalen Rattenmyokards kamen kürzlich zu ähnlichen Ergebnissen (289).

4.2. Gibt es mehr als einen spezifischen Rezeptor für Herzglykoside in Hühnerherzzellen in Kultur?

Die unterschiedliche Affinität und Glykosidempfindlichkeit verschiedener Tierspezies hat an Bedeutung gewonnen, seit an der gegenüber Digitalis relativ insensitiven Spezies Ratte Hinweise für das Vorliegen von mindestens zwei spezifischen Glykosidrezeptoren gefunden wurden, wobei der Besetzung des hochaffinen Rezeptors ein positiv inotroper Effekt und der Besetzung des niederaffinen Rezeptors eine Hemmung der $(Na^{+} + K^{+})$ -ATPase und des aktiven Kationentransports zuzuordnen war (80). Dieser Befund stellt die am häufigsten für die Erklärung der kontraktionskraftsteigernden Wirkung von Herzglykosiden herangezogene Hypothese ernsthaft in Frage, wonach eine Hemmung der $(Na^{+} + K^{+})$ -ATPase eine obligate Voraussetzung für das Auftreten eines positiv inotropen Effektes ist (117, 144, 208, 246).

Weitere Untersuchungen an Herzen der Ratte und des Meerschweinchens ergaben ebenfalls Anhaltspunkte, die für das Vorliegen von mindestens 2 Rezeptoren für g-Strophanthin sprechen (37, 87, 95, 112, 120, 289). Dagegen wurde in den meisten Studien mit digitalissensitiven Spezies wie Mensch, Rind, Hund, Katze nur 1 Art von Bindungsstelle für g-Strophanthin nachgewiesen (11, 32, 82, 246).

Neueren Befunden zufolge läßt sich die Hypothese eines Ein-Rezeptorensystems in digitalissensitiven Spezies (84) nicht mehr uneingeschränkt aufrechterhalten, da auch in Herzgewebe des Menschen, des Hundes und des Rinds mittlerweile 2 spezifische Bindungsstellen für Herzglykoside beschrieben wurden (36, 61, 280). Umgekehrt ist von anderen Arbeitsgruppen nur eine Klasse von hochaffinen Bindungsstellen für g-Strophanthin in Herzmuskel-Zellkulturen neonataler Ratten und Cardiozyten erwachsener Ratten beschrieben worden (1, 203).

Da somit noch nicht endgültig geklärt ist, ob überhaupt - und wenn ja - unter welchen Bedingungen und an welchen Tierspezies 2 Rezeptoren für Herzglykoside existieren, wurde dieser Frage

auch wegen der sich daraus möglicherweise ergebenden weitreichenden Konsequenzen (s. EINLEITUNG) an Hühnerherzzellen in Kultur speziell nachgegangen. Die hierzu durchgeführten Experimente erbrachten folgende Ergebnisse:

- a) Die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle ist sättigbar (Abb. 1/2/3 a).
- b) Assoziation und Dissoziation von g-Strophanthin zeigen nach Einsetzen in die entsprechenden Reaktionsgleichungen 2. bzw. 1. Ordnung monophasischen Verlauf (3.1.4.1., 3.1.4.2., Abb. 5) und sind daher mit der Bindung an eine einheitliche Klasse von Bindungsstellen vereinbar.
- c) Die Messung der konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seine Bindungsstelle unter Gleichgewichtsbedingungen und anschließendes Auftragen der erhaltenen Daten nach Scatchard (239) ergibt eine Gerade (3.1.3., Abb. 3 b), d. h. alle vorhandenen spezifischen g-Strophanthin-Bindungsstellen weisen bei jeder im Meßbereich liegenden Glykosidkonzentration (in diesem Falle $1.6 \times 10^{-8}\text{M} - 10^{-5}\text{M}$) immer eine gleich große Affinität gegenüber dem g-Strophanthin-Molekül auf. Dies spricht für die Existenz einer einheitlichen Klasse von g-Strophanthin-Bindungsstellen.
- d) Auftragen der Assoziations- und Dissoziationsraten bei verschiedenen Temperaturen nach Arrhenius liefert jeweils eine Gerade (Abb. 6/7). Daraus ergeben sich einheitliche Aktivierungsenergien sowohl für die Assoziations- als auch die Dissoziationsreaktion des Glykosid-Rezeptor-Komplexes.
- e) Die Besetzung der Rezeptoren durch g-Strophanthin führt im selben Konzentrationsbereich auch zu einer Kontraktionskraftsteigerung der Muskelzelle und zur Hemmung der Na^+ -Pumpe (Tab. 2; Abb. 15). Niedrigeren oder höheren Konzentrationen an g-Strophanthin (entsprechend einem möglichen zweiten Rezeptorentyp) konnte keine weitere spezifische Wirkung zugeordnet werden.

Die unter a - e aufgeführten Befunde zeigen, daß sich zumindest unter unseren Versuchsbedingungen keine Anhaltspunkte für mehr als eine Art von Glykosidrezeptoren mit qualitativ oder

quantitativ grundsätzlich unterschiedlichen Eigenschaften in der kultivierten Hühnerherzzelle finden lassen. Entsprechendes gilt auch für den Glykosidrezeptor in Zellmembran-Präparationen aus kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen (vgl. 4.1.1.7.).

Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit Untersuchungen von Smith u. Mit., die an Hühnerherz-Muskelzellkulturen ebenfalls eine Art von Rezeptor für g-Strophanthin mit einer Dissoziationskonstante von $1.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (bei 0 mM K^+) nachweisen konnten (257). Kazazoglou u. Mit. dagegen fanden sowohl in Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur als auch in Hühnerherz-Membranhomogenaten einen gekrümmten Scatchard-Plot für die konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin unter Gleichgewichtsbedingungen und schlossen auf die Existenz von mindestens 2 spezifischen Bindungsstellen im Hühnermyokard: eine hochaffine ($K_D = 3.3 \times 10^{-8} \text{ M}$) mit niedriger Kapazität ($B_{\text{max}} = 1.2 \text{ pmol/mg Protein}$) und eine niederaffine ($K_D = 3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$) mit hoher Kapazität ($B_{\text{max}} = 11.8 \text{ pmol/mg Protein}$; 157).

Eine befriedigende Erklärung für diese widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse ist gegenwärtig nicht möglich: Alle drei Arbeitsgruppen verwendeten 10 - 12 Tage alte embryonale Hühnerherzen, die nach Behandlung mit 0.05 % Trypsin dissoziieren und als Zellrasen kultiviert werden können. Die benutzten Inkubationsmedien (CMRL-1415-ATM; Eagle's minimal essential medium) weisen nur geringfügige Unterschiede bezüglich ihrer Elektrolytzusammensetzung auf. Insbesondere waren die Kaliumgehalte der Lösungen nicht grundsätzlich verschieden (0 mM K^+ bei 157, 257; 0.75 mM K^+ in eigenen Versuchen). Lediglich die Dauer, für die die Zellrasen bei der Ermittlung der konzentrationsabhängigen ^3H -g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen inkubiert wurden, variierte beträchtlich von 15 min (157) bis 120 min (eigene Versuche). Von beiden Gruppen konnte jedoch gezeigt werden, daß die ^3H -g-Strophanthin-Bindung nach 15 Minuten einen Gleichgewichtszustand erreicht hat und über mehrere Stunden stabil ist, so daß auch dieser Punkt nicht die divergierenden Befunde zu erklären vermag.

Um sicher auszuschließen, daß die widersprüchlichen Ergebnisse auf Unterschieden im experimentellen Aufbau beruhen, wurden in unserem Labor die ^3H -g-Strophanthin-Bindungsstudien an Hühnerherz-Muskelzellen unter den von Kazazoglou u. Mit. beschriebenen Versuchsbedingungen (Inkubationszeit = 15 min, $[\text{K}^+] = 0 \text{ mM}$) in CMRL-1415-ATM Medium wiederholt. Auch hierbei ergab die Auftragung der Meßergebnisse der konzentrationsabhängigen g-Strophanthin-Bindung nach Scatchard eine Gerade, was wiederum für die Existenz nur einer Klasse von spezifischen Glykosidbindungsstellen im Hühnermyokard spricht (Reithmann, unveröffentlicht).

Bei einer kritischen Wertung der vorliegenden Veröffentlichungen muß zudem immer berücksichtigt werden, daß der sichere Nachweis eines Zwei-Rezeptorensystems nicht problemlos ist. Er stützt sich im wesentlichen auf die Messung einer biphasischen Assoziations- und Dissoziationsreaktion des Glykosid-Rezeptor-Komplexes und einer Krümmung der Kurve für die konzentrationsabhängige Glykosidbindung bei Auftragung nach Scatchard (239). Solche Phänomene können jedoch auch beispielsweise durch negative Kooperativität, unterschiedliche Bindungsaffinitäten des radioaktiv und des nicht radioaktiv markierten Liganden, Instabilität der Bindungsstelle oder durch einen Zwei-Stufen-Prozeß bei der Liganden-Rezeptor-Interaktion sowie durch eine Reihe weiterer Faktoren hervorgerufen werden (Überblick bei 82) und die Existenz von zwei unterschiedlichen Glykosidrezeptoren nur vortäuschen.

Sollte in kultivierten Hühnerherz-Muskelzellen jedoch tatsächlich - wie von Kazazoglou u. Mit. beschrieben - eine zweite Art von spezifischer g-Strophanthin-Bindungsstelle existieren, so ist die Bindung des Glykosids an diese Bindungsstelle nach übereinstimmenden Befunden aller Autoren allerdings weder mit einer Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ noch mit einer positiv inotropen Wirkung auf die Kontraktilität der Zellen verknüpft (157, 257, vorliegende Arbeit) und kann daher nicht als Herzglykosid-Rezeptor bezeichnet werden.

4.3. Korrelation von g-Strophanthin-Rezeptor-Besetzung,
Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und intrazellulärem
 K^+ -Gehalt

Der spezifische Rezeptor für Herzglykoside und der enzymatische Wirkort der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase sind beide auf derselben Polypeptidkette des Enzyms lokalisiert (166, 167, 168, 237). Diesem strukturellen Befund entsprechend wurde eine konstante Beziehung zwischen der maximalen ^3H -g-Strophanthin-Bindungskapazität und der Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Membranpräparationen des Herzens nachgewiesen (70, 175). Erdmann u. Mit. fanden darüber hinaus in Membranhomogenaten des menschlichen Herzens und des Rinderhirns, daß die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an seinen Rezeptor eine Enzymhemmung von gleichem Ausmaß hervorruft (72, 74). Eine solche stöchiometrische Kopplung im Verhältnis 1 : 1 bedeutet beispielsweise, daß eine 50 %ige Rezeptorbesetzung auch eine 50 %ige Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität nach sich zieht.

Dieser lineare Zusammenhang von Glykosidbindung und Enzymaktivität konnte an ATPase-Präparationen des Herzens, der Niere und des Gehirns von Mensch, Katze, Rind, Schaf und Hund vielfach bestätigt werden (13, 72, 75, 130, 137, 209, 275). Auch an Erythrozyten von Mensch und Truthahn wurde eine derartige Beziehung gefunden (83, 106, 109, 141). Im Zusammenhang mit der Tatsache, daß in den genannten Spezies immer nur eine einheitliche Art von Glykosidrezeptor nachgewiesen wurde, dessen Besetzung zur Kontraktionskraftsteigerung der entsprechenden Herzmuskelpräparate führte, sprach der oben genannte Befund für eine kausale Verknüpfung von Hemmung der Na^+ -Pumpe mit dem Auftreten von positiver Inotropie (7, 35, 76, 117, 144, 246, 247, 248).

Eine Reihe neuerer Untersuchungen stellt jedoch diese "klassische Theorie" der Digitaliswirkung ernsthaft in Frage. So konnte z. B. gezeigt werden, daß g-Strophanthin im Myokard der Spezies Ratte, Meerschweinchen und Frosch zwar gebunden wird

und seine positiv inotrope Wirkung entfaltet, ohne jedoch gleichzeitig eine entsprechende Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zu bewirken. Diese tritt erst bei höheren, toxischen Digitaliskonzentrationen auf (37, 80). Auch bei Messungen des $^{42}\text{K}^+$ bzw. der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme des schlagenden Herzmuskels sowie der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte unter positiv inotrop wirkenden Glykosidkonzentrationen konnte die Mehrzahl der Untersucher keinen Hinweis für eine Hemmung des aktiven Kationentransports finden (40, 88, 184, 214, 217, 235). Es wurde sogar über eine Stimulation der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase bzw. eine Erhöhung der intrazellulären K^+ -Gehalte unter den genannten Bedingungen berichtet (51, 63, 118, 216).

Bei der Wertung der zitierten Literatur muß jedoch immer berücksichtigt werden, daß eine Korrelation von Herzglykosid-Bindung und Na^+ -Pumpaktivität bzw. intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalten im intakten Herzmuskelpräparat oder gar beim lebenden Versuchstier sehr problematisch ist, da eine simultane Messung der genannten Parameter aus methodischen Gründen (zeitraubende und mechanisch/biochemisch eingreifende Vorgänge bei der Präparation des Myokards) nicht exakt durchgeführt werden kann (8, 82). Auch ist umstritten, ob die Bestimmung der Glykosidwirkung auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Zellmembranpräparationen wegen der hier fehlenden transmembranalen Ionengradienten und der teilweisen Zerstörung der Membranstruktur als objektives Maß für das Verhalten der Na^+ -Pumpe in vivo (z. B. in der intakten Herzzelle) dienen kann (30). Schließlich sind Fehlinterpretationen auf Grund des bezüglich seiner Zellzusammensetzung inhomogenen Untersuchungsmaterials denkbar (vgl. 1.2.1. und 4.1.4.).

Durch Studien an kultivierten, intakten Hühnerherzzellen lassen sich die erwähnten Fehlermöglichkeiten weitgehend ausschließen. So bieten Zellkulturen im Gegensatz zu intaktem Muskelgewebe wegen geringerer technischer Schwierigkeiten bei der Aufbereitung des Zellmaterials die Möglichkeit, Glykosidbindung und Glykosidwirkung gleichzeitig zu messen (3.3.).

Weiterhin weisen sie anders als Zellmembranpräparationen wegen ihrer unzerstörten Zellmembran noch die physiologischen transmembranalen Ionengradienten auf. Schließlich gestattet die Zellkulturtechnik die getrennte Züchtung von verschiedenen Zellarten und damit die Separation eines ursprünglich inhomogenen Untersuchungsmaterials in seine einzelnen Bestandteile. Die genannten Vorteile machen intakte, kultivierte Herzzellen zu einem geeigneten Versuchsmodell, den Zusammenhang zwischen Herzglykosid-Bindung und Herzglykosid-Wirkung getrennt für 2 Zellarten zu untersuchen und auf diese Weise Ursachen für die - wie oben dargelegt - uneinheitlichen Ergebnisse in der Literatur aufzuzeigen.

An dem zuvor gut charakterisierten Glykosid-Rezeptor-System der Hühnerherzzelle (s. ERGEBNISSE und 4.1.) wurden daher die Bindung von ^3H -g-Strophanthin und das Verhalten des aktiven Kationentransports gleichzeitig in ein und demselben Experiment und getrennt für Muskelzellen und Bindegewebszellen gemessen (3.3.). Es zeigt sich, daß die Konsequenzen der spezifischen Glykosidbindung in diesen Zellpopulationen höchst unterschiedlich sind, obwohl ein einheitlicher Rezeptortyp in beiden Zellarten vorliegt (4.1.4.). Während in Bindegewebszellen die Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und der Abfall des intrazellulären K^+ -Gehaltes direkt mit der Glykosidbindung im Sinne einer 1 : 1-Korrelation verknüpft sind, findet man an der spontan schlagenden Hühnerherz-Muskelzelle ein völlig anderes Bild. Hier können zwischen 40 - 50 % der Rezeptoren mit ^3H -g-Strophanthin-Molekülen besetzt sein, ohne daß die transmembranalen Kationen-Transportprozesse wesentlich beeinflußt werden (Abb. 15/16; 3.3.).

Dieser Befund an der Hühnerherz-Muskelzelle stimmt dabei sehr gut mit früheren Studien an Herzzellen überein, wo eine teilweise Hemmung der Na^+ -Pumpe durch niedrige, aber positiv inotrope Dosen von Herzglykosiden nur geringfügige Veränderungen der zellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte bewirkte (115, 177, 214) und deutliche Elektrolytverschiebungen erst bei toxischen Dosen von Digitalis auftraten (184). Auch die Arbeitsgruppe

von Smith u. Mit. konnte kürzlich an Hühnerherz-Muskelzellen zeigen, daß mehr als 10 % der vorhandenen ATPase-Moleküle gehemmt sein müssen, um meßbare Veränderungen des monovalenten, aktiven Kationenflusses zu sehen (257).

In diesem Zusammenhang wurde von Smith u. Mit. zu bedenken gegeben, daß bei der von uns gewählten extrazellulären K^+ -Konzentration von 0.75 mM (Kim et al. verwenden 4.0 mM) bereits ein Teil der Na^+ -Pumpaktivität in Hühnerherz-Muskelzellen gehemmt ist und daher das wirkliche Ausmaß der g-Strophanthin bedingten Hemmung des Enzyms verglichen mit Messungen bei höheren K^+ -Konzentrationen unterschätzt worden sei (158, 257). Diese Hypothese könnte in der Tat eine Erklärung für die quantitativ unterschiedlichen Ergebnisse geben, die die beiden Arbeitsgruppen bezüglich der Herzglykosid-Toleranz der Na^+ -Pumpe im embryonalen Hühnerherzen gefunden haben (40 %ige bzw. 10 %ige Besetzung der Rezeptoren führen zur meßbaren Pump-hemmung).

Allerdings sprechen unsere Untersuchungen an Hühnerherz-Bindegewebszellen eher gegen diese Möglichkeit, da hier g-Strophanthin trotz einer K^+ -Konzentration von 0.75 mM bereits bei geringgradiger Besetzung der Rezeptoren zu einer meßbaren Hemmung der Pumpaktivität führt (s. 3.3.).

In jedem Fall jedoch deuten sowohl die Studien von Smith u. Mit. als auch die eigenen Versuchsergebnisse darauf hin, daß Hühnerherz-Muskelzellen im Gegensatz zu Bindegewebszellen die Hemmung ihrer Na^+ -Pumpe durch Herzglykoside bis zu einem gewissen Grad (möglicherweise abhängig von der extrazellulären K^+ -Konzentration) zu kompensieren vermögen. Eine Stimulation der Na^+ -Pumpe durch geringe Digitaliskonzentrationen konnte von uns in dem untersuchten Bereich von $> 10^{-8} M$ g-Strophanthin in Hühnerherzzellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 15), ebenso wenig wie dieses Phänomen von anderen Autoren an der schlagenden, kultivierten Muskelzelle reproduzierbar beobachtet wurde (203, 257, 289).

4.3.1. Unterschiedliches Kopplungsverhältnis von Herzglykosid-Bindung und Hemmung der Na^+ -Pumpe in Muskel- und Bindegewebszellen des Hühnerherzens

4.3.1.1. Erklärungsmöglichkeiten

Die in dieser Studie vorgelegten Daten (s.a. 3.3., Abb. 15/16) demonstrieren eindeutig, daß das Kopplungsverhältnis von Herzglykosid-Bindung und Hemmung des aktiven Kationentransports in verschiedenen Zellarten desselben Organs und derselben Tierspezies sehr unterschiedlich sein kann. Alle Versuche, die Diskrepanz im Verhalten von Muskel- und Bindegewebszellen des Hühnerherzens zu erklären, müssen zum gegenwärtigen Zeitpunkt als spekulativ angesehen werden. Mehrere Ursachen sind jedoch im Lichte der neueren Literatur denkbar:

- 1) Transportreserve der Na^+ -Pumpe: Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der Na^+ -Pumpe in Herzmuskelzellen durch die Höhe der intrazellulären Na^+ -Konzentration bestimmt, da diese etwa so hoch ist wie die Michaeliskonstante der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ für Natriumionen (295). Die Bindung von Glykosiden an das Enzym führt zu dessen Hemmung, d. h. die intrazelluläre Na^+ -Konzentration wird ansteigen und damit auch die Aktivität der restlichen, noch nicht von Glykosidmolekülen besetzten Pumpmoleküle (7). Auf diese Weise könnte eine beträchtliche Rezeptorbesetzung kompensiert werden und das Elektrolytgleichgewicht durch die noch freien Na^+ -Pumpen annähernd aufrechterhalten werden (19, 221).

Zwar wurde in einigen neueren Untersuchungen eine geringgradige Zunahme der intrazellulären Na^+ -Konzentration nach Glykosidapplikation festgestellt (Überblick bei 11), jedoch besteht auch hier eine deutliche Diskrepanz zwischen den beobachteten Änderungen der Gewebskonzentrationen für Na^+ - und K^+ -Ionen (5 - 20 %) und dem Grad der zugehörigen Hemmung der Enzymaktivität (40 - 60 %) bei Gabe positiv inotrop wirksamer Glykosiddosen. Dies läßt ebenfalls auf eine Reservekapazität der Na^+ -Pumpe im Herzmuskel schließen.

Eine derartige Transportreserve muß im Herzmuskel allein schon deshalb existieren, da das bei jeder Membranerregung in die Zelle einströmende Natrium auch auf Dauer keine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration zur Folge hat (23). Durch sehr hohe Depolarisationsfrequenzen der Zellmembran (Elektrostimulation) und g l e i c h - z e i t i g e partielle Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch Herzglykoside kann jedoch ein Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration (bzw. ein Abfall der intrazellulären K^+ -Konzentration) provoziert werden (6, 23). Unter diesen Bedingungen reicht dann offensichtlich die Reservekapazität der Pumpe nicht mehr aus. Einige gewichtige experimentelle Befunde sprechen somit für die Existenz einer funktionellen Transportreserve an der intakten Herzmuskelzelle. Als Mechanismus ist dabei sowohl eine Steigerung der Transportrate pro Enzymmolekül als auch eine Aktivierung von zuvor "stummen" Pumpmolekülen denkbar (170). Das erst bei höhergradiger Glykosid-Rezeptor-Besetzung erfolgende Absinken des transmembranalen Kationenflusses in Hühnerherz-Muskelzellen könnte durch dieses Modell befriedigend erklärt werden.

Für die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Bindegewebszellen wäre dann jedoch zu fordern, daß sie entweder keine oder nur geringe Möglichkeiten hat, ihre Aktivität zu ändern oder daß sie unter unseren Versuchsbedingungen bereits maximal stimuliert ist (z. B. intrazelluläre Na^+ -Konzentration im Sättigungsbereich der Transportkinetik) und daher ein Ausfall von Pumpmolekülen nicht mehr kompensiert werden kann. Untersuchungen hierzu liegen allerdings nicht vor. Von der physiologisch-teleologischen Seite betrachtet wäre ein solch unterschiedliches Verhalten von Muskel- und Bindegewebszellen ohne weiteres denkbar, da im intakten Lebewesen an die Muskelzelle und hier v. a. an die Herzmuskelzelle wesentlich höhere Anpassungsanforderungen (z. B. Aufrechterhaltung eines adäquaten Ionenmilieus auch bei Tachykardie) gestellt werden als an Bindegewebszellen.

- 2) Verschiedene Glykosidrezeptoren in Muskel- und Bindegewebszellen: Der widersprüchliche experimentelle Befund in Muskel- und Bindegewebszellen kann auch mit der Vorstellung in Einklang gebracht werden, daß die Muskelzelle zwei funktionell verschiedene Rezeptoren besitzt, wobei nur die Besetzung des niederaffinen mit einer Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase verknüpft ist, während die Besetzung des hochaffinen Rezeptors möglicherweise über einen noch unbekannten Mechanismus zur Kontraktionskraftsteigerung führt (88).

Ein derartiges Zwei-Rezeptorensystem ist bereits für kultivierte Rattenherzzellen beschrieben (289). Auch an der Hühnerherz-Muskelzelle wurden von Kazazoglou u. Mit. zwei spezifische Bindungsstellen für Digitalis gefunden (157). Festzuhalten bleibt jedoch, daß die eigenen Untersuchungen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Smith u. Mit. (257) nur die Existenz eines spezifischen, aktiven Rezeptors für Herzglykoside in kultivierten Hühnerherzzellen belegen (s. 4.1. und 4.2.).

- 3) Unterschiedliche Stöchiometrie von Glykosidrezeptoren und Phosphorylierungsstellen der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase: Während die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in den verschiedenen untersuchten Geweben in der Regel eine Herzglykosid-Bindungsstelle pro Phosphorylierungsstelle besitzt, wurden in der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase der Meerschweincheniere vier Herzglykosid-Bindungsstellen pro Phosphorylierungsstelle gefunden (70). Es wäre denkbar, daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase der Hühnerherzzelle z. B. zwei Bindungsstellen pro Phosphorylierungsstelle besitzt, die beide abgesättigt werden müssen, ehe eine Blockierung des Enzyms eintritt (87). Auch dieser Mechanismus würde die nicht-stöchiometrische Kopplung von Glykosidbindung und Hemmung der Na^+ -Pumpe erklären und muß durch Bestimmung der Phosphorylierungsstellen mittels (γ - ^{32}P)-ATP in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase angereicherten Membranpräparationen des Hühnerherzens näher untersucht werden.

- 4) Unterschiedliche Isoenzyme der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in Muskel- und Bindegewebszellen des Hühnerherzens: Das morphologische Korrelat der Na^+ -Pumpe, die durch Na^+ und K^+ -Ionen aktivierbare ATPase, ist in den verschiedenen Organen und Spezies nicht immer ein einheitliches Enzym, sondern weist offensichtlich eine gewisse strukturelle Variabilität auf. So kann das Vorliegen zweier $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Formen im Säugerhirn als gesichert gelten (47, 266). Auch im Rattenherzen ergaben sich experimentelle Hinweise für die Existenz von mehreren (vermutlich drei) verschiedenen ATPase-Formen (197, 198). Eine unterschiedliche Antigenität der ATPase in Nerven, Niere und Skelettmuskulatur des Hühnerembryos ist ebenfalls beschrieben worden (91). Es wäre daher vorstellbar, daß auch in kultivierten Muskelzellen und Bindegewebszellen des Hühnerherzens unterschiedliche $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Isoenzyme existieren, die durch einen unterschiedlichen Kopplungsgrad zu dem differierenden Verhalten dieser beiden Zellarten nach Bindung von g-Strophanthin führen.
- 5) De-novo-Synthese von ATPase-Molekülen: Als Ursache für die Fähigkeit von Herzmuskelzellen, eine steigende Rezeptorbesetzung und Enzymhemmung kompensieren zu können, muß auch die Möglichkeit einer vermehrten Neusynthese von Na^+ -Pumpmolekülen mit konsekutiver Erhöhung der Enzymdichte auf der Zelloberfläche in Betracht gezogen werden. So fanden Werdan u. Mit., daß Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur die Zahl ihrer Glykosidbindungsstellen und damit ihrer funktionellen Na^+ -Pumpmoleküle unter 72stündiger Inkubation mit g-Strophanthin um bis zu 90 % erhöhen können (286). Smith u. Mit. konnten ebenfalls eine Zunahme der g-Strophanthin-Bindungsstellen um bis zu 40 % des Kontrollwertes bei längerdauernder Inkubation der Zellkulturen in strophanthinhaltigem Medium nachweisen (257). Dieser Effekt scheint jedoch nur bei Verwendung toxischer, nicht aber therapeutischer Dosen von g-Strophanthin und langen Inkubationszeiten (48 - 72 h) aufzutreten (286, 257). Unter unseren Versuchsbedingungen (4 h Inkubation, "therapeutische Dosen" von g-Strophanthin)

konnte eine derartige Steigerung der maximalen g-Strophanthin-Bindungskapazität nicht nachgewiesen werden (286).

Eine Neusynthese von Enzymmolekülen als Antwort der Zelle auf die Hemmung ihrer Na^+ -Pumpen wäre in diesem Zusammenhang auch nur dann von Bedeutung, wenn sie spezifisch für Muskelzellen wäre, da Bindegewebszellen - wie gezeigt - eine Inhibierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase nicht kompensieren können. Doch auch ruhende HeLa- und Girardi-Zellen scheinen auf chronische g-Strophanthin-Exposition mit einer Zunahme ihrer Glykosidrezeptoren zu reagieren (28, 29, 272). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß chronischer Kaliummangel in kultivierten Hühnerherz-Bindegewebszellen ebenfalls eine Steigerung der Zahl an g-Strophanthin-Bindungsstellen hervorzurufen vermag (287). Damit kann relativ sicher ausgeschlossen werden, daß dem nachgewiesenermaßen unterschiedlichen Kopplungsgrad von Glykosidbindung und Hemmung des aktiven Kationentransports in Muskel- und Bindegewebszellen eine unterschiedliche Fähigkeit der Zellen zur kompensatorischen De-novo-Synthese von Na^+ -Pumpmolekülen zugrunde liegt bzw. unter unseren Versuchsbedingungen Relevanz besitzt.

4.3.1.2. Schlußfolgerungen

Ungeachtet der sich letztlich als zutreffend erweisenden Erklärungsmöglichkeit können aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse schon jetzt folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- 1) Unter unseren Versuchsbedingungen - bei einer K^+ -Konzentration von 0.75 mM - weisen intakte, kultivierte Muskelzellen und Bindegewebszellen des embryonalen Hühnermyokards eine einheitliche Art von Herzglykosid-Rezeptor auf. Die funktionellen Auswirkungen der Glykosidbindung an diesen Rezeptor sind jedoch unterschiedlich:

Während eine 10 %ige Hemmung der Na^+ -Pumpe in Bindegewebszellen eine 10 %ige Glykosid-Rezeptor-Besetzung erfordert, ist der gleiche Effekt in Muskelzellen erst nach Absättigung von annähernd 50 % aller vorhandenen spezifischen g-Strophanthin-Bindungsstellen zu beobachten. Damit wurde zumindest in einem Fall nachgewiesen, daß verschiedene Zellarten desselben Organs und derselben Tierspezies trotz identischer Eigenschaften ihres Herzglykosid-Rezeptors eine deutlich unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber diesem Pharmakon besitzen können.

Dieser Befund muß vor allem bei der Interpretation von Untersuchungsergebnissen berücksichtigt werden, die an Versuchspräparaten erhalten wurden, welche sich aus verschiedenen Zellarten zusammensetzen (z. B. intaktes Myokard, Zellhomogenate des gesamten Herzmuskels). Auch dürfen die an einer Zellart erhobenen Befunde - z. B. Veränderungen der Herzglykosid-Rezeptordichte im menschlichen Erythrozyten bei chronischer Digitalisapplikation (100) und Hypokaliämie (77, 81) - nicht ohne Einschränkung auf eine andere Zellart, z. B. die Herzmuskelzelle, übertragen werden. Zumindest in quantitativer Hinsicht können dabei, wie Abb. 16 zeigt, beträchtliche zellspezifische Unterschiede auftreten.

- 2) Die positiv inotrope Wirkung von Herzglykosiden tritt bereits bei einer Rezeptorbesetzung im Herzen von $\approx 30\%$ auf (6, 82, 85). Bei einer Glykosidbindung dieses Ausmaßes konnten jedoch nur wenige Untersucher eine signifikante Änderung des aktiven ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transportes und der zellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte im aktiven Herzmuskel oder in Herzmuskel-Membranpräparationen beobachten. Dies hat verschiedentlich zu der Schlußfolgerung geführt, daß die positiv inotrope Wirkung von Herzglykosiden von einer Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase unabhängig sein müsse (vgl. EINLEITUNG).

Demgegenüber zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß in der isolierten kultivierten Herzmuskelzelle bei positiv inotrop wirksamen Glykosiddosen zwar eine geringe ($< 10\%$), aber dennoch meßbare Hemmung des transmembranalen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transportes und eine Verschiebung der zellulären Kationengehalte auftritt (Abb. 16). In diesem Zusammenhang sind Messungen mit in die Zelle eingebrachten, ionenselektiven Elektroden von Interesse, die ebenfalls einen geringen, aber reproduzierbaren Anstieg der intrazellulären Na^+ -Aktivität in Gegenwart positiv inotroper Herzglykosid-Konzentrationen ergeben haben (182, 271, 278). Die "klassische Theorie" zum Wirkmechanismus von Digitalis, in der der positiv inotrope Effekt und die Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase durch das Pharmakon kausal miteinander verknüpft werden (s. EINLEITUNG), erfährt durch diese Befunde eine weitere Bestätigung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In intakten kultivierten Muskelzellen und Bindegewebszellen sowie in Zellmembranen des embryonalen Hühnerherzens wurde die ^3H -g-Strophanthin-Bindung und die Hemmung der Na^+ -Pumpe bzw. der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ durch g-Strophanthin charakterisiert:

- 1) In Hühnerherz-Muskelzellen bindet g-Strophanthin sättigbar, temperaturabhängig und reversibel an eine einheitliche Art von Bindungsstelle. Assoziation und Dissoziation verlaufen dabei entsprechend einer Reaktionskinetik 2. bzw. 1. Ordnung ($k_{+1} = 3.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, $k_{-1} = 4.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$). Die Dissoziationskonstante (K_D) der spezifischen g-Strophanthin-Bindung beträgt $1.5 \times 10^{-7} \text{M}$, die maximale Bindungskapazität (B_{max}) $2.6 \text{ pmol/mg Protein}$. Dies entspricht einer Zahl von ca. 860 000 Bindungsstellen pro Muskelzelle. Nach Hitzedenaturierung der Zellmembran erfolgt keine spezifische Bindung mehr. Kalium vermindert die Assoziationsrate k_{+1} , nicht jedoch die Dissoziationsrate k_{-1} und die maximale Kapazität der g-Strophanthin-Bindung.
- 2) Für Hühnerherz-Bindegewebszellen ergeben sich vergleichbare Daten für die g-Strophanthin-Bindung ($k_{+1} = 2.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, $k_{-1} = 2.8 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$, $K_D = 1.9 \times 10^{-7} \text{M}$, $B_{\text{max}} = 2.1 \text{ pmol/mg Protein}$, ca. 300 000 Bindungsstellen/Zelle).
- 3) Die Bindung von g-Strophanthin an Hühnerherzzellen führt zu einer Hemmung der Natriumpumpe (ersichtlich an einer Abnahme des aktiven K^+ -Transports), zu einem Abfall der zellulären K^+ -Gehalte und zu einem Anstieg der zellulären Na^+ -Gehalte. Der halbmaximale Effekt (IC_{50}) wird bei einer g-Strophanthin-Konzentration von $10^{-7} - 10^{-6} \text{M}$ erreicht.
- 4) Die an der intakten Hühnerherzzelle gefundenen Daten stimmen gut mit Ergebnissen überein, die an Zellmembranen

desselben Gewebes für die g-Strophanthin-Bindung ($K_D = 4.3 \times 10^{-7} M$) und die durch Strophanthin induzierte Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase ($IC_{50} = 1.4 \times 10^{-6} M$) erhalten wurden.

- 5) In Übereinstimmung mit den allgemeinen Kriterien für Glykosidrezeptoren (82) kann aus den vorgelegten Untersuchungsergebnissen geschlossen werden, daß die so charakterisierte spezifische g-Strophanthin-Bindungsstelle identisch mit dem Herzglykosid-Rezeptor in Hühnerherzellen ist.
- 6) In Herzbindegewebszellen besteht eine strenge stöchiometrische Korrelation von g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung und Hemmung des aktiven K^+ -Transports. Dagegen führt in Herzmuskelzellen eine Besetzung von 40 % der vorhandenen Rezeptoren nur zu einer Hemmung des aktiven K^+ -Transports von weniger als 10 %. Die Ursache für diesen zellspezifischen Unterschied ist noch nicht bekannt. Die nicht lineare Korrelation von Glykosidbindung und Glykosidwirkung in Muskelzellen könnte jedoch erklären, warum es in Gegenwart therapeutischer Dosen von Herzglykosiden ($\hat{=}$ Rezeptorbesetzung von ca. 20 - 30 %) zu keinen meßbaren oder nur sehr geringen Veränderungen der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte kommt.
- 7) In Muskelzellen, Bindegewebszellen und Zellmembranen des embryonalen Hühnerherzens liegt ein einheitlicher Rezeptor für Digitalis vor. Im Gegensatz zu den von Kazazoglou u. Mit. erhobenen Befunden (157) liefern die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse gegenwärtig keine experimentellen Hinweise, die für die Existenz eines zweiten oder weiterer in ihren Eigenschaften unterschiedlicher Herzglykosid-Rezeptoren im Hühnermyokard sprechen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, R. J., SCHWARTZ, A., GRUPP, G., GRUPP, I.,
LEE, S. W., WALLICK, E. T., POWELL, T., TWIST, V. W.,
GATHIRAM, P.:
High-affinity ouabain binding site and low dose positive
inotropic effect in rat myocardium.
Nature 296, 167 - 169 (1982)
2. ADLER, C. P., RINGLAGE, W. P., BÖHM, N.:
DNS-Gehalt und Zellzahl in Herz und Leber von Kindern.
Vergleichende biochemische, cytophotometrische und histo-
logische Untersuchungen.
Path. Res. Pract. 172, 25 - 41 (1981)
3. AITON, J. F., LAMB, J. F., OGDEN, P.:
Down regulation of the sodium pump following chronic
exposure of HeLa cells and chick embryo heart cells to
ouabain.
Br. J. Pharmacol. 73, 333 - 340 (1981)
4. AKERA, T., LARSEN, F. S., BRODY, T. M.:
The effect of ouabain on sodium and potassium-activated
adenosine triphosphatase from the hearts of several
mammalian species.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 17 - 26 (1969)
5. AKERA, T., BASKIN, S. I., TOBIN, T., BRODY, T. M.:
Ouabain: temporal relationship between the inotropic
effect and the in vitro binding to, and dissociation from
(Na⁺ + K⁺)-activated ATPase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 151 - 162
(1973)
6. AKERA, T., BENNETT, R. T., OLGAARD, M. K., BRODY, T. M.:
Cardiac Na⁺ -, K⁺-adenosine triphosphatase inhibition by
ouabain and myocardial sodium: a computer simulation.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 287 - 297 (1976)
7. AKERA, T.:
Membrane Adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor?
Science, 198, 569 - 574 (1977)
8. AKERA, T., BRODY, T. M.:
The role of Na⁺ + K⁺-ATPase in the inotropic action of
digitalis.
Pharmacol. Rev. 29, 187 - 220 (1977)
9. AKERA, T., OLGAARD, M. K., TEMMA, K., BRODY, T. M.:
Development of the positive inotropic action of ouabain:
effects of transmembrane sodium movement.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 203, 675 - 684 (1977)
10. AKERA, T., YAMAMOTO, S., TEMMA, K., KIM, D. H.,
BRODY, T. M.:
Is ouabain-sensitive rubidium or potassium uptake a
measure of sodium pump activity in isolated cardiac
muscle?
Biochim. Biophys. Acta 640, 779 - 790 (1981)
11. AKERA, T.:
Effects of cardiac glycosides on Na⁺ - K⁺-ATPase.
In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/1,
"Cardiac Glycosides", Herausgeber: K. Greef; Springer
Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 287 - 327 (1981)

12. ALLEN, J. C., SCHWARTZ, A.:
Effects of potassium, temperature and time on ouabain interaction with the cardiac Na^+ , K^+ ATPase: further evidence supporting an allosteric site.
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 39 - 45 (1970)
13. ALLEN, J. C., MARTINEZ-MALDONADO, M., EKNOYAN, G., SUKI, W. N., SCHWARTZ, A.: Relation between digitalis binding in vivo and inhibition of sodium, potassium-adenosine triphosphatase in canine kidney.
Biochem. Pharmacol. 20, 366 - 370 (1971)
14. ARNOLD, S. B., BYRD, R. C., MEISTER, W., MELMON, K., CHEITLIN, M. D., BRISTOW, J. D., PARMLEY, W. W., CHATTERJE, K.:
Long-term digitalis therapy improves left ventricular function in heart failure.
N. Engl. J. Med. 303, 1443 - 1448 (1980)
15. AUCLAIR, M. C., VERNIMMEN, C.: Electro-optical technique for recording in contractile activity of cultured heart cells.
Biol. Cellulaire 37, 125 - 130 (1980)
16. BAKER, P. F., BLAUSTEIN, M. P., HODGKIN, A. L., STEINHARDT, R. A.:
The influence of calcium on sodium efflux in squid axons.
J. Physiol. 200, 431 - 458 (1969)
17. BAKER, P. F., WILLIS, J. S.:
Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells.
Nature 226, 521 - 523 (1970)
18. BAKER, P. F., WILLIS, J. S.:
On the number of sodium pumping sites in cell membranes.
Biochim. Biophys. Acta 183, 646 - 649 (1970)
19. BAKER, P. F., WILLIS, J. S.:
Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells.
J. Physiol. 224, 441 - 462 (1972)
20. BARRY, W. H., GOLDMINZ, D., KIMBALL, T., FITZGERALD, J. W.:
Influence of cell dissociation and culture of chick embryo ventricle on inotropic responses to calcium and lanthanum.
J. Mol. Cell. Card. 10, 967 - 979 (1978)
21. BARRY, W. H., BIEDERT, S., MIURA, D. S., SMITH, T. W.:
Changes in cellular Na^+ , K^+ und Ca^{2+} contents, monovalent cation transport rate and contractile state during wash-out of cardiac glycosides from chick heart cells.
Circ. Res. 49, 141 - 149 (1981)
22. BAURIEDEL, G.:
Myokardiale Wirkungen des Spurenelementes Vanadium: Untersuchungen an kultivierten Herzzellen.
Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1983)
23. BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, T., PROPPE, D.:
Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle.
Brit. J. Pharmacol. 61, 19 - 27 (1977)

24. BIEDERT, S., BARRY, W. H., SMITH, T. W.:
Inotropic effects and changes in sodium-calcium contents associated with inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured myocardial cells.
J. Gen. Physiol. 74, 479 - 494 (1979)
25. BLINKS, J. R., KOCH-WESER, J.:
Physical factors in the analysis of the actions of drugs on myocardial contractility.
Pharmacol. Rev. 15, 531 - 599 (1963)
26. BLONDEL, B., ROIJEN, J., CHENEVAL, J. P.:
Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts.
Experientia 27, 356 - 358 (1971)
27. BLOOM, S.:
Requirements for spontaneous contractility in isolated adult mammalian heart muscle cells.
Exp. Cell. Res. 69, 17 - 24 (1971)
28. BOARDMAN, L. J., LAMB, J. F., MC CALL, D.:
Uptake of ^3H -ouabain.
J. Physiol. (London) 225, 619 - 635 (1972)
29. BOARDMAN, L. J., HUETT, M., LAMB, J. F., NEWTON, J. P., POLSON, J. M.:
Evidence for the genetic control of the sodium pump density in HeLa cells.
J. Physiol. 241, 771 - 794 (1974)
30. BODEMANN, H. H.:
Das Problem des zellulären Herzglykosidrezeptors.
Klin. Wochenschr. 59, 1333 - 1343 (1981)
31. BOGENMANN, E., EPPENBERGER, H. M.:
DNA-synthesis and polyploidization of chicken heart muscle cells in mass cultures.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 17 - 27 (1980)
32. BOSALLER, C., SCHMOLDT, A.:
Dehydro-digitoxosides of digitoxigenin and digoxigenin: binding to beef heart $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in relation to unchanged digitoxosides.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 306, 11 - 15 (1979)
33. BRADING, A. F., WIDDICOMBE, J. H.:
An estimate of sodium/potassium pump activity and the number of pump sites in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli using (^3H) -ouabain.
J. Physiol. 238, 235 - 249 (1974)
34. BRODIE, B. B., BEAVEN, M. A., EVJAVEC, F., JOHNSON, H. L.:
Uptake and release of ^3H -histamine.
In: Mechanisms of release of biogenic amines, ed. by v. Euler, Rosell and Uvnas, Pergamon Press, 401 - 416 (1966)
35. BRODY, T. M., AKERA, T.:
Relations among $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity, sodium pump activity, transmembrane sodium movement, and cardiac contractility.
Fed. Proc. 36, 2219 - 2224 (1977)

36. BROWN, L., ERDMANN, E.:
Binding of Dihydrodigitoxin to beef and human cardiac
($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase: evidence for two binding sites in cell
membranes.
Biochem. Pharmacol. 32, 3183 - 3190 (1983)
37. BROWN, L., WERDAN, K., ERDMANN, E.:
Consequences of specific ^3H -ouabain binding to guinea pig
left atria and cardiac cell membranes.
Biochem. Pharmacol. 32, 423 - 435 (1983)
38. BROWNING, D. J., GUARNIERI, Th., STRAUSS, H. C.:
Ouabain effects on intracellular potassium activity and
contractile force in cat papillary muscle.
J. Clin. Invest. 68, 942 - 956 (1981)
39. BURROWS, R., LAMB, J. F.:
Sodium and potassium fluxes in cells cultured from chick
embryo heart muscle.
J. Physiol. 162, 510 - 531 (1962)
40. BUSSE, F., LÜLLMANN, H., PETERS, T.:
Concentration dependence of the binding of ouabain to
isolated guinea pig atria.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 1, 687 - 698 (1979)
41. CALDWELL, P. C. and KEYNES, R. D.:
The effects of ouabain on the efflux of sodium from a
squid giant axon.
J. Physiol. 148, 8 - 9 (1959)
42. CARAFOLI, E.:
The calcium cycle of mitochondria.
FEBS Lett. 104, 1 - 5 (1979)
43. CATTEL, M., GOLD, H.:
The influence of digitalis glycosides on the force of
contraction of mammalian cardiac muscle.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 62, 116 - 125 (1938)
44. CAVANAUGH, M. W.:
Pulsation, migration and division of dissociated chick
embryo heart cells in vitro.
J. Exp. Zool. 128, 573 - 589 (1955)
45. CHARLEMAGNE, D., LE LIEVRE, L., JOLLES, P., PARAF, A.:
Plasma membrane studies on drug sensitive and resistant
cell lines - III. Biphasic kinetics of ouabain binding.
Biochem. Pharmacol. 28, 3513 - 3518 (1979)
46. CHARNOCK, J. S., COOK, D. A., ALMEIDA, A. F., TO, R.:
Activation energy and phospholipid requirements of
membrane-bound adenosine triphosphatases.
Arch. Biochem. Biophys. 159, 393 - 399 (1973)
47. CHARNOCK, J. S., SIMONSON, L. P., ALMEIDA, A. F.:
Variation in sensibility of the cardiac glycoside recep-
tor characteristics of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase to lipolysis and
temperature.
Biochim. Biophys. Acta 465, 77 - 92 (1977)
48. CHOI, Y. R., AKERA, T.:
Kinetics studies on the interaction between ouabain and
($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 481, 648 - 659 (1977)

49. CLAUSEN, T., HANSEN, O.:
Ouabain Binding and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -transport in rat muscle cells and adipocytes.
Biochim. Biophys. Acta 345, 387 - 404 (1974)
50. COHEN, A., GROS, F., BUCKINGHAM, M.:
Cell division and differentiation in heart cell cultures from eleven day chick embryos.
Biol. Cellulaire 38, 171 - 178 (1980)
51. COHEN, I., DAUT, J., NOBLE, D.:
An analysis of the actions of low concentrations of ouabain on membrane currents in purkinje fibres.
J. Physiol. (Lond.) 260, 75 - 103 (1976)
52. COOK, J. S., TATE, E. H., SHAFFER, C.:
Uptake of ^3H -ouabain from the cell surface into the lysosomal compartment of HeLa cells.
J. Cell. Physiol. 110, 84 - 92 (1976)
53. COOPER, T., WILLIAM, V. L., HANLOU, C. R.:
Influence of cardiac innervation on the response of the heart to adrenergic agents.
In: Factors influencing myocardial contractility. Ed.: Tanz, Kavalier and Roberts, Acad. Press, New York - London, 465 - 478 (1967)
54. COURAUD, F., ROCHAT, H., LISSITZKY, S.:
Stimulation of sodium and calcium uptake by scorpion toxin in chick embryo heart cells.
Biochim. Biophys. Acta 443, 90 - 100 (1976)
55. CROMPTON, M., CAPANO, M., CARAFOLI, E.:
The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium.
Europ. J. Biochem. 69, 453 - 462 (1976)
56. CUSTER, W. O., SIMON, A. B.:
A comparison of sodium, chloride, thiocyanate, and sucrose spaces as estimates of extracellular fluid volume.
Physiol. Chem. Phys. 12, 205 - 213 (1980)
57. DAHL, J. L., HOKIN, L. E.:
The sodium-potassium adenosinetriphosphatase.
Ann. Rev. Biochem. 43, 327 - 356 (1974)
58. DANI, A. M., CITTADINI, A., FLAMINI, G., FESTUCCIA, G., TERRANOVA, T.:
Preparation and some properties of isolated beating myocytes from adult rabbit heart.
J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 777 - 784 (1977)
59. DAUT, J., RÜDEL, R.:
Cardiac glycoside binding to the Na/K -ATPase in the intact myocardial cell: Electrophysiological measurement of chemical kinetics.
J. Mol. Cell Cardiol. 13, 777 - 782 (1981)
60. DE HAAN, R. L.:
Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture.
Dev. Biol. 16, 216 - 249 (1967)

61. DE POVER, A., GODFRAIND, T.:
Interaction of ouabain with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from human heart and from guinea-pig heart
Biochem. Pharmacol. 28, 3051 - 3056 (1979)
62. DETH, R. C., LYNCH, C. J.:
The binding of ^3H -ouabain to $\text{Na}^+ - \text{K}^+\text{-ATPase}$ sites in arterial smooth muscle.
Pharmacology 21, 29 - 37 (1980)
63. DIACONO, J.:
Suggestive evidence for the activation of an electrogenic sodium pump in stimulated rat atria: apparent discrepancy between the pump inhibition and the positive inotropic response induced by ouabain.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 5 - 30 (1979)
64. DOW, J. W., HARDING, N. G. L., POWELL, T.:
Isolated cardiac myocytes. I. Preparation of adult myocytes and their homology with intact tissue.
Cardiovasc. Res. 15, 483 - 514 (1981)
65. DOW, J. W., HARDING, N. G. L., POWELL, T.:
Isolated cardiac myocytes. II. Functional aspects of mature cells.
Cardiovasc. Res. 15, 549 - 579 (1981)
66. DRANSFELD, H., GREEF, K., BERGER, H., CAUTIUS, V.:
Die verschiedene Empfindlichkeit der $\text{Na}^+ - \text{K}^+\text{-aktivierte}$ ATPase des Herz- und Skelettmuskels gegen k-Strophanthin .
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharm. 254, 225 - 234 (1966)
67. DUNHAM, P. B., HOFFMANN, J. F.:
The number of $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ pump sites on red blood cells from HK and LK lambs
Biochim. Biophys. Acta 241, 399 - 402 (1971)
68. ELLORY, J. C., KEYNES, R. D.:
Binding of tritiated digoxin to human red cell ghosts.
Nature (Lond.) 221, 776 (1969)
69. ELSAS, L. J., WHEELER, F. B., DANNER, D. J.,
DE HAAN, R. L.:
Amino acid transport by aggregates of cultured chicken heart cells. Effect of insulin.
J. Biol. Chem. 250, 9381 - 9390 (1975)
70. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ preparations from different tissues and species. I. Determination of kinetic constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta 307, 386 - 398 (1973)
71. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta 330, 302 - 315 (1973)
72. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335 - 356 (1974)

73. ERDMANN, E., HASSE, W.:
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes.
J. Physiol. (Lond.) 251, 671 - 682 (1975)
74. ERDMANN, E., PATZELT, R., SCHONER, W.:
The cardiac glycoside receptor: its properties and its correlation to nucleotide binding sites, phosphointermediate, and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity.
Rec. Adv. Stud. Card. Struct. Metab. 9, 329 - 335 (1976)
75. ERDMANN, E., PRESEK, P., SWOZIL, R.:
Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von g-Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen.
Klin. Wochenschr. 54, 383 - 387 (1976)
76. ERDMANN, E.:
Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart.
Basic Res. Cardiol. 72, 315 - 325 (1977)
77. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W.:
Increased number of ouabain binding sites in human erythrocyte membranes in chronic hypokalaemia.
Acta Biol. Med. Germ. 36, 879 - 883 (1977)
78. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., PRESEK, P.:
Receptor for cardiac glycosides
In: Riecker, G., Weber, A., Goodwin, J. (eds.), Myocardial failure, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 120 - 131 (1977)
79. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., KOCH, M.:
Cardiac glycoside receptors in disease. The number of ouabain binding sites in human erythrocytes is subject to regulation.
In: $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase: structure and kinetics; Skou, J. C., Nørby, J. G. (eds.), 517 - 524 (1979), London-Academic Press
80. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.:
Cardiac glycoside receptor, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity and force of contraction in rat heart.
Biochem. Pharmacol. 29, 3219 - 3229 (1980)
81. ERDMANN, E., WERDAN, K., HEGELBERGER, R., PRUCHNIEWSKI, M., CHRISTL, S.:
Determination of the number of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase molecules, their enzymatic activity and the active Na^+/K^+ -transport of human erythrocytes in hypokalaemia and in hypertension.
In: H. Zumkley, H. Losse (Hrsg.): Intracellular electrolytes and arterial hypertension; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 164 - 170 (1980)
82. ERDMANN, E.:
Influence of cardiac glycosides on their receptor.
In: Handbook of Exp. Pharmacol. 56/I, "Cardiac Glycosides", Herausgeber: K. Greef; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 337 - 380 (1981)

83. ERDMANN, E., BOLTE, H.-D.:
Über den Mechanismus der Herzglykosidwirkung unter besonderer Berücksichtigung des Digitoxins.
In: Digitalistherapie bei Herzinsuffizienz; K. Kochsiek, N. Rietbrock (Hrsg.); Urban und Schwarzenberg Verlag, 66 - 70 (1981)
84. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.:
Evidence for two receptors for cardiac glycosides in the heart.
In: Cell membrane in function and dysfunction of vascular tissue; Godfraind, T., Meyer, P. (eds.); Elsevier North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 76 - 84 (1981)
85. ERDMANN, E.:
Biochemische Grundlagen der Wirkung von Digitalisglykosiden.
In: Fortschritte in der Kardiologie; Herausgeber: W. Schaper u. M. G. Gottwik; Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforschung 48, 7 - 18 (1982)
86. ERDMANN, E.:
Therapie mit Herzglykosiden
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1983)
87. ERDMANN, E., BROWN, L., WERDAN, K.:
Two receptors for cardiac glycosides in the heart.
Suppl. to Basic Res. Cardiol. 79, 91 - 96 (1984)
88. ERDMANN, E., WERDAN, K., BROWN, L.:
Neue Befunde zum Wirkungsmechanismus der Herzglykoside.
In: Herzinsuffizienz - Pathophysiologie, Klinik und Therapie. Herausgeber: J. Keul, H. H. Dickhuth; Perimed-Verlag Erlangen, 248 - 254 (1984)
89. ERTEL, R. J., CLARKE, D. E., CHAO, J. C., FRANKE, F. R.:
Autonomic receptor mechanisms in embryonic chick myocardial cell cultures.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 178, 73 - 80 (1971)
90. FABIATO, A., FABIATO, F.:
Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs.
Eur. J. Cardiol. 1, 145 - 155 (1973)
91. FAMBROUGH, D. M., BAYNE, E. K.:
Multiple forms of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase in the chicken. Selective detection of the major nerve, skeletal muscle and kidney form by a monoclonal antibody.
J. Biol. Chem. 258, 3926 - 3935 (1983)
92. FÄNGE, R., PERSSON, H., THESLEFF, S.:
Electrophysiologic and pharmacological observations on trypsin-disintegrated embryonic chick hearts cultured in vitro.
Acta Physiol. Scand. 38, 173 - 183 (1956)
93. FARMER, B. B., HARRIS, R. A., JOLLY, W. W., HATHAWAY, D. R.,
KATZBERG, A., WATANABE, A. M., WHITLOW, A. L., BESCH Jr., H. R.:
Isolation and Characterization of adult rat heart cells.
Arch. Biochem. Biophys. 179, 545 - 558 (1977)

94. FAYET, G., COURAUD, F., MIRANDA, F., LISSITZKY, S.:
Electrooptical system for monitoring activity of heart cells in culture: application to the study of several drugs and scorpion toxins.
Europ. J. Pharmacol. 27, 165 - 174 (1974)
95. FINET, M., NOEL, F., GODFRAIND, T.:
Inotropic effect and binding sites of ouabain to rat heart.
Arch. int. Pharmacodyn. 256, 168 - 170 (1982)
96. FINGL, E., WOODBURY, L. A., HECHT, H. H.:
Effects of innervation and drugs upon direct membrane potentials of embryonic chick myocardium.
J. Pharmacol. 104, 103 - 114 (1952)
97. FISHMAN, D. A., MOSCONA, A. A.:
An electron microscope study of in vitro dissoziation and reaggregation of embryonic chick and mouse heart cells.
J. Cell. Biol. 43, 37A (1969)
98. FLASCH, H., HEINZ, H.:
Correlation between inhibition of (Na^+, K^+) -membrane-ATPase and positive inotropic activity of cardenolides in isolated papillary muscles of guinea pig.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304, 37 - 44 (1978)
99. FORBUSH, B., HOFFMAN, J. F.:
Evidence that ouabain binds to the same large polypeptide chain of dimeric Na^+, K^+ -ATPase that is phosphorylated by P_i .
Biochemistry 18, 2308 - 2315 (1979)
100. FORD, A. R., ARONSON, J. K., GRAHAME-SMITH, D. G., CURRER, J. G.:
The acute changes seen in cardiac glycoside receptor sites, ⁸⁶Rubidium uptake and intracellular sodium concentrations in the erythrocytes of patients during the early phases of digoxin therapy are not found during chronic therapy: pharmacological and therapeutic implications for chronic digoxin therapy.
Br. J. Clin. Pharmacol. 8, 135 - 142 (1979)
101. FÖRSTER, W., SCHRÖR, K., WEISS, M.:
Wechselwirkungen zwischen den Prostaglandinen E_2 und F_{2a} und Isoprenalin am Hundeherzen in situ.
Acta Biol. Med. Germ. 34, 501 - 506 (1975)
102. FORTES, G.:
Anthrolyouabain: a specific fluorescent probe for the cardiac glycoside receptor of the Na - K -ATPase.
Biochemistry 16, 531 - 540 (1977)
103. FRICKE, U., KLAUS, W.:
Evidence for two different Na^+ -dependent 3H -ouabain binding sites of a $(Na^+ + K^+)$ -ATPase of guinea pig heart.
Br. J. Pharmacol. 61, 423 - 428 (1977)
104. FRIEDMAN, I., SCHWALB, H., HELLAQ, H., PINSON, A., HELLER, M.:
Interactions of cardiac glycosides with cultured cardiac cells. II. Biochemical and electron microscopic studies on the effects of ouabain on muscle and non muscle cells.
Biochim. Biophys. Acta 598, 272 - 284 (1980)

105. FUJINO, S., KAWAGISHI, S., EGUCHI, N., TANAKA, M.:
Binding site of ouabain in cardiac muscle cell and its
positive inotropic effect in cat.
Jpn. J. Pharmacol. 21, 423 - 425 (1971)
106. FURUKAWA, H., BILEZIKIAN, J. B., LOEB, J. N.:
Kinetics and thermodynamics of ouabain binding by intact
turkey erythrocytes.
J. Gen. Physiol. 76, 499 - 516 (1980)
107. FURUKAWA, H., BILEZIKIAN, J. P., LOEB, J. N.:
Effects of ouabain and isoproterenol on potassium influx
in the turkey erythrocyte. Quantitative relation to
ligand binding and cyclic AMP generation.
Biochim. Biophys. Acta 598, 345 - 356 (1980)
108. GARDNER, J. D., CONLON, T. P.:
The effects of sodium and potassium on ouabain binding by
human erythrocytes.
J. Gen. Physiol. 60, 609 - 629 (1972)
109. GARDNER, J. D., KIINO, D. R.:
Ouabain binding and cation transport in human erythro-
cytes.
J. Clin. Invest. 52, 1845 - 1851 (1973)
110. GARDNER, J. D., KIINO, D. R., SWARTZ, T. J.,
BUTLER, V. P. Jr.:
Effects of digoxin-specific antibodies on accumulation
and binding of digoxin by human erythrocytes.
J. Clin. Invest. 52, 1820 - 1823 (1973)
111. GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.:
Stimulation and inhibition by ouabain of the sodium pump
in guinea pig atria.
Br. J. Pharmacol. 55, 249 (1975)
112. GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.:
Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardio-
active steroids in relation to their binding sites and
their inotropic effect on guinea-pig isolated atria.
Br. J. Pharmacol. 66, 175 - 184 (1979)
113. GLITSCH, H. G., REUTER, H., SCHOLZ, H.:
The effect of the internal sodium concentration on
calcium fluxes in isolated guinea pig auricles.
J. Physiol. 209, 25 - 43 (1970)
114. GLYNN, I. M.:
Activation of adenosine triphosphatase activity in cell-
membrane by external potassium and internal sodium.
J. Physiol. (Lond.) 160, 18 (1962)
115. GLYNN, I. M.:
The action of cardiac glycosides on ion movements.
Pharmacolog. Rev. 16, 381 - 407 (1964)
116. GLYNN, I. M., KARLISH, S. J. D.:
The sodium pump.
Ann. Rev. Physiol. 37, 13 - 55 (1975)
117. GODFRAIND, T.:
Cardiac glycoside receptors in the heart.
Biochem. Pharmacol. 24, 823 - 827 (1975)

118. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.:
Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump.
Nature 265, 165 - 166 (1977)
119. GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.:
Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na^+/K^+ pump.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3067 - 3069 (1980)
120. GODFRAIND, T., NOEL, F., FINET, M.:
Calcium regulatory mechanisms involved in the inotropic effect of digitalis.
J. Mol. Cell. Cardiol. 15 (8) Supplement 2, 43 (1983)
121. GOELDNER, M. P., HIRTH, C. G., ROSSI, B., PONZIO, G., LAZDUNSKI, M.:
Specific photoaffinity labeling of the digitalis binding site of the sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase induced by energy transfer.
Biochemistry 22, 4685 - 4690 (1983)
122. GOSHIMA, K., WAKABAYASHI, S.:
Involvement of an $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchange system in genesis of ouabain induced arrhythmias of cultured myocardial cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 489 - 509 (1981)
123. GOTH, A.:
Mechanisms of histamine release by polymeric compounds
In: Mechanisms of release of biogenic amines; v. Euler, Rosell, Uvnas (eds.), Pergamon Press, 371 - 379 (1966)
124. GRIEPP, E. B., BERNFIELD, M. R.:
Acquisition of synchronous beating between embryonic heart cell aggregates and layers.
Exp. Cell. Res. 113, 263 - 272 (1978)
125. GROSSE-BROCKHOFF, F., HAUSAMEN, T. U.:
200 Jahre Herztherapie mit Digitalis.
Dtsch. Med. Wschr. 100, 1980 - 1991 (1975)
126. GULPER, J. B., CATTERALL, W. A.:
Developmental changes in the sensitivity of embryonic heart cells to tetrodotoxin and D-600.
Dev. Biol. 65, 216 - 227 (1978)
127. HAGOPIAN, M., ANVERSA, P., LOUD, A.:
Quantitative radioautographic localization of newly synthesized protein in the postnatal rat heart.
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 357 - 367 (1975)
128. HALBERT, S. P., BRUDERER, R., THOMPSON, E.:
Growth of dissociated beating human heart cells in tissue culture.
Life Sciences 13, 969 - 975 (1973)
129. HALLE, W., JENTSCH, K. D.:
Aktuelle Probleme der Wirkstoffforschung.
Pharmazie 29, 433 - 442 (1974)
130. HANSEN, O.:
The relationship between g-strophanthin-binding capacity and ATPase activity in plasma-membrane fragments from ox brain.
Biochim. Biophys. Acta 233, 122 - 132 (1971)

131. HANSEN, O.:
Non-uniform populations of g-strophanthin binding sites of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. Apparent conversion to uniformity by K^+ .
Biochim. Biophys. Acta 433, 383 - 392 (1976)
132. HARARY, I., HOOVER, F., FARLEY, B.:
The isolation and cultivation of rat heart cells.
Methods Enzymol. 32, 740 - 745 (1974)
133. HARRIS, J. E.:
The reversible nature of the potassium loss from erythrocytes during storage of blood at 2 - 5 °C.
Biol. Bull. 79, 373 (1940)
134. HART, G., NOBLE, D., SHIMONI, Y.:
The effect of low concentrations of cardiotonic steroids on membrane currents and tension in sheep purkinje fibres.
J. Physiol. 334, 103 - 131 (1983)
135. HAUSTEIN, K. O., HAUPTMANN, J.:
Studies on cardioactive steroids. II. Structure-activity relationships in the isolated guinea pig heart.
Pharmacology 11, 129 - 138 (1974)
136. HEALY, G. M., PARKER, R. C.:
An improved chemically defined basal medium (CMRL-1415) for newly explanted mouse embryo cells.
J. Cell. Biol. 30, 531 - 538 (1966)
137. HEGYVARY, C., POST, R. L.:
Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 246, 5234 - 5240 (1971)
138. HERMANN, J. J.:
Thermodynamics of ouabain binding to human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 598, 456 - 462 (1980)
139. HERMSMEYER, K., ROBINSON, R. B.:
High sensitivity of cultured cardiac muscle cells to autonomic agents.
Am. J. Physiol. 233, 172 - 179 (1977)
140. HOFFMANN, J. F.:
The red cell membrane and the transport of sodium and potassium.
Am. J. Med. 41, 666 - 680 (1966)
141. HOFFMANN, J. F.:
The interaction between tritiated ouabain and the Na-K-pump in red blood cells.
J. Gen. Physiol. 54, 343 - 350 (1969)
142. HOUGEN, T. J., SMITH, T. W.:
Inhibition of myocardial monovalent cation active transport by subtoxic doses of ouabain in the dog.
Circ. Res. 42, 856 - 863 (1978)
143. HOUGEN, T. J., SPICER, N., SMITH, T. W.:
Stimulation of monovalent active cation transport by low concentrations of cardiac glycosides.
Role of catecholamines.
J. Clin. Invest. 68, 1207 - 1214 (1981)

144. HUANG, W., RHEE, H. M., CHIU, T. H., ASKARI, A.:
Re-evaluation of the relationship between the positive inotropic effect of ouabain and its inhibitory effect on $(Na^+ + K^+)$ -dependent adenosine triphosphatase in rabbit and dog hearts.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 211, 571 - 582 (1979)
145. INAGAKI, C., LINDENMAYER, G. E., SCHWARTZ, A.:
Effects of sodium and potassium on binding of ouabain to the transport adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 249, 5135 - 5140 (1974)
146. ISENBERG, G.:
Contractility of isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence for an intracellular mode of action. Suppl. to Bas. Res. Cardiol. 79, 56 - 71 (1984)
147. JACOBSON, S. L.:
Culture of spontaneously contracting myocardial cells from adult rats.
Cell. Struct. Funct. 2, 1 - 9 (1977)
148. JONES, J. L., JONES, R. E.:
Determination of safety factor for defibrillator waveforms in cultured heart cells.
Am. J. Physiol. 242, 662 - 670 (1982)
149. JÖRGENSEN, P.:
Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase - IV. Conformational changes in the enzyme transition between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool.
Biochim. Biophys. Acta 401, 399 - 415 (1975)
150. JÖRGENSEN, P.:
Mechanisms of the Na^+ , K^+ pump. Protein structure and conformations of the pure $(Na^+ + K^+)$ -ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 694, 27 - 68 (1982)
151. JOSEPHSON, I., SPERELAKIS, N.:
Local anesthetic blockade of Ca^{2+} -mediated action potentials in cardiac muscle.
Eur. J. Pharmacol. 40, 201 - 208 (1976)
152. JOSEPHSON, I., SPERELAKIS, N.:
5'-guanylimidodiphosphate stimulation of slow Ca^{2+} current in myocardial cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 1157 - 1166 (1978)
153. KASTEN, F. H.:
Electron microscope studies of the combined effects of trypsinization and centrifugation on rat heart cells, with observation of early cultures:
J. Cell. Biol. 31, 131 A (1966)
154. KASTEN, F. H.:
Mammalian myocardial cells.
In: Tissue culture - methods and applications. Herausgeber: Kruse, P. F. Jr., Patterson, M. K. Jr.; Academic Press, New York, 72 - 81 (1973)
155. KATZ, A. M.:
Contractile proteins of the heart.
Physiol. Rev. 50, 63 - 158 (1970)

156. KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S., ROST, B.:
Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter
embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen.
Pflügers Archiv 311, 25 - 49 (1969)
157. KAZAZOGLU, T., RENAUD, J. F., ROSSI, B., LAZDUNSKI, M.:
Two classes of ouabain receptors in chick ventricular
cardiac cells and their relation to (Na^+, K^+) -ATPase
inhibition, intracellular Na^+ -accumulation, Ca^{2+} influx,
and cardiotoxic effect.
J. Biol. Chem. 258, 12163 - 12170 (1983)
158. KIM, D., BARRY, W. H., SMITH, T. W.:
Kinetics of ouabain binding and changes in cellular
sodium content, Na^+ -transport and contractile state
during ouabain exposure in cultured chick heart cells.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 231, 326 - 333 (1984)
159. KIM, D., MARSH, J. P., BARRY, W. H., SMITH, T. W.:
Effects of growth in low potassium medium or ouabain on
membrane Na^+ , K-ATPase cation transport and contractility
in cultured chick heart cells.
Circ. Res. 55, 39 - 48 (1984)
160. KIMELBERG, H. K., MAYHEW, E.:
Cell growth and ouabain sensitive $^{86}Rb^+$ uptake and $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity in 3 T 3 and SV 40 transformed 3 T 3
fibroblasts.
Biochim. Biophys. Acta 455, 865 - 875 (1976)
161. KLEINFELD, M., SCHADE, O., GRUEN, F.:
Action of diphenylhydantoin on rhythmicity and con-
tractility of cultured embryonic heart cells
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 84 - 90 (1969)
162. KOIDL, B., TRITTHART, H. A.:
The effects of ouabain on the electrical and mechanical
activities of embryonic chick heart cells in culture.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 663 - 673 (1980)
163. KOIDL, B., TRITTHART, H. A., ERKINGER, S.:
Cultured embryonic chick heart cells: Photometric measure-
ment of the cell pulsation and the effects of calcium
ions, electrical stimulation and temperature.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 165 - 178 (1980)
164. KOIDL, B., TRITTHART, H. A.:
D-600 blocks spontaneous discharge, excitability and
contraction of cultured embryonic chick heart cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 14, 251 - 257 (1982)
165. KU, D., AKERA, T., PEW, C. L., BRODY, T. M.:
Cardiac glycosides: correlations among Na^+ - K^+ -ATPase,
sodium pump and contractility in the guinea pig heart.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285, 185 - 200
(1974)
166. KYTE, J.:
The titration of the cardiac glycoside binding site of
the $(Na^+ + K^+)$ -adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 247, 7634 - 7641 (1972)
167. KYTE, J.:
Properties of the two polypeptides of sodium- and
potassium-dependent adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 247, 7642 - 7649 (1972)

168. KYTE, J.:
Structural studies of sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. The relationship between molecular structure and mechanism of active transport.
J. Biol. Chem. 250, 7443 - 7449 (1975)
169. LAMB, J. F., MC CALL, D.:
Uptake of ^3H -Ouabain and Na pump turnover rates in monolayer cultures of Girardi heart cells.
J. Physiol. 213, 57 - 58 (1970)
170. LAMB, J. F., MAC KINNON, M. G. A.:
Effect of ouabain and metabolic inhibitors on the Na-K movements and nucleotide contents of L-cells.
J. Physiol. 213, 665 - 682 (1971)
171. LAMB, J. F., MC CALL, D.:
Effect of prolonged ouabain treatment on Na, K, Cl and Ca concentration and fluxes in cultured human cells.
J. Physiol. 225, 599 - 617 (1972)
172. LAMB, J. F., OGDEN, P.:
Vinblastine and cloroquine on the reappearance of Na pump sites after glycoside block in HeLa cells.
J. Physiol. 316, 8 - 9 (1981)
173. LAMB, J. F., OGDEN, P.:
Internalisation of ouabain and replacement of sodium pump in the plasma membranes of HeLa cells following block with cardiac glycosides.
Quart. J. Exp. Physiol. 67, 105 - 119 (1982)
174. LANDOWNE, D., RITCHIE, J. M.:
The binding of tritiated ouabain to mammalian non myelinated nerve fibres.
J. Physiol. 207, 529 - 537 (1970)
175. LANE, L. K., COPENHAVER, J. H. jr., LINDENMAYER, G. E., SCHWARTZ, A.:
Purification and characterization of and ^3H -ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney.
J. Biol. Chem. 248, 7197 - 7200 (1973)
176. LANGER, G. A., SATO, E., SERYDARIAN, M.:
Calcium exchange in a single layer of rat cardiac cells studied by direct counting of cellular activity of labelled calcium.
Circ. Res. 24, 589 - 597 (1969)
177. LANGER, G. A., SERENA, S. D.:
Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium: relative to control of active state.
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 65 - 90 (1970)
178. LANGER, G. A., FRANK, J. S.:
Calcium exchange in cultured cardiac cells.
In: Developmental and physiological correlates of cardiac muscle; M. Liebermann, T. Sano, (eds.); New York, Raven Press 117 - 126 (1972)
179. LANGER, G. A.:
Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart.
Biochem. Pharmacol. 30, 3261 - 3264 (1981)

180. LAUF, P. K., JOINER, C. H.:
Increased potassium transport and ouabain binding in human Rh^{null} red blood cells.
Blood 48, 457 - 468 (1976)
181. LE DUARIN, G., SUIGNARD, G., KHASKYIE, A., RENAUD, D.:
Sensibilité aux catécholamines des cardiomyoblastes embryonnaires de poulet isolés en culture in vitro.
C. R. Acad. Sci. 278, 2943 - 2945 (1974)
182. LEE, Ch. O., KANG, D. H., SOKOL, J. H., LEE, D. S.:
Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac purkinje fibres exposed to dehydro-ouabain.
Biophys. J. 29, 315 - 330 (1980)
183. LEE, Ch. O., VASALLE, M.:
Modulation of intracellular Na⁺ activity and cardiac force by norepinephrine and Ca²⁺.
Ann. J. Physiol. 244, 110 - 114 (1983)
184. LEE, K. S., KLAUS, W.:
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.
Pharm. Rev. 23, 193 - 261 (1971)
185. LEFKOWITZ, R., O'HARA, D., WARSHAW, J. B.:
Surface interaction of ³H-norepinephrine with cultured chick embryo myocardial cells.
Biochim. Biophys. Acta 332, 317 - 328 (1974)
186. LEWIS, H., HARARY, I.:
In vitro studies of beating heart cells in culture - XIV. Reversible changes in the level of myosin adenosintri-phosphatase.
Arch. Biochem. Biophys. 142, 501 - 507 (1971)
187. LIEBERMANN, M., ADAM, W. J., BULLOCK, PH. N.:
The cultured heart cells: problems and prospects
In: Methods in Cell Biology, Vol. 21 A, Academic Press 187 - 202 (1980)
188. LINDENMAYER, G. E., SCHWARTZ, A.:
Nature of the transport adenosine triphosphatase digi-talis complex
J. Biol. Chem. 248, 1291 - 1300 (1973)
189. LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E., WEISS, L., HARPER, H. A.:
Physiologische Chemie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979)
190. LÖHR, E., MAKOSKI, H. B., GOBBELER, T., STRÖTGES, M. W.:
Beitrag zu der Membranpermeabilität von Cardiaca (g-Strophanthin, Digoxin, Oxyfedrin) auf Grund von Mikroauto-radiographien am Meerschweinchenherzen.
Arzneimittelforschung 21, 921 - 927 (1971)
191. LOMPRES, A. M., POGGIOLO, J., VASSORT, G.:
Maintenance of fast Na-channels during primary cultures of embryonic chick heart cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 813 - 825 (1979)
192. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

193. LÜLLMANN, H., PETERS, T.:
Studies on the side of action of cardiac glycosides.
Symposium on Digitalis, Oslo; Gyldendal Norsk Forlag,
Oslo, Norway 125 - 131 (1973)
194. LÜLLMANN, H., PETERS, T.:
Action of cardiac glycosides.
Prog. Pharmacol. 2, 5 - 57 (1979)
195. MANERY, J. F., DRYDEN, E. E., SHILL, J. S.,
MADAPALLIMATTAM, G.:
Enhancement (by ATP, insulin and lack of divalent cations)
of ouabain inhibition of cation transport and ouabain
binding in frog skeletal muscle; effect of insulin and
ouabain on sarcolemmal $(Na^+ + K^+)MgATPase$
Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 21 - 33 (1977)
196. MANSIER, P., LE LIEVRE, L. G.:
 Ca^{2+} -free perfusion of rat heart reveals a $(Na^+ + K^+)$ -
ATPase form highly sensitive to ouabain.
Nature 300, 535 - 537 (1982)
197. MANSIER, P., CASSIDY, P. S., CHARLEMAGNE, D.,
PRETESEILLE, M., LE LIEVRE, L. G.:
Three Na^+ , K^+ -ATPase forms in rat heart as revealed by
 K^+ /ouabain antagonism.
FEBS Letters 153, 357 - 360 (1983)
198. MARSH, J. D., LOH, E., LACHANCE, D., BARRY, W. H.,
SMITH, T. W.:
Relationship of binding of a calcium channel blocker to
inhibition of contraction in intact cultured embryonic
chick ventricular cells.
Circ. Res. 53, 539 - 543 (1983)
199. MARVIN, W. J., ROBINSON, R. B., HERMSMEYER, K.:
Correlation of function and morphology of neonatal rat
and embryonic chick cultured cardiac and vascular muscle
cells.
Circ. Res. 45, 528 - 540 (1979)
200. MASSON-PEVET, M., JONGSMA, H. J., DE BRUIJNE, J.:
Collagenase - and trypsin-dissociated heart cells: a
comparative ultrastructural study.
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 747 - 757 (1976)
201. MATSUI, H., SCHWARTZ, A.:
ATP-dependent binding of 3H -digoxin to a Na^+ , K^+ -ATPase
from cardiac muscle.
Fed. Proc. 26, 398 (1967)
202. MATSUI, H., SCHWARTZ, A.:
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the $(Na^+ + K^+)$
dependent ATPase from cardiac tissue.
Biochim. Biophys. Acta 151, 655 - 663 (1968)
203. MC CALL, D.:
Cation exchange an glycoside binding in cultured rat
heart cells.
Am. J. Physiol. 236, 87 - 95 (1979)
204. MC CURTHY, L. P., LEE, W. P., SHIDEMANN, F. E.:
Measurements of the inotropic effects of drugs on the
innervated and non innervated embryonic chick heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 129, 315 - 321 (1960)

205. MC DONALD, T. F., DE HAAN, R. L.:
Ion levels and membrane potentials in chick heart tissue and cultured cells.
J. Gen. Physiol. 61, 89 - 109 (1973)
206. MC LEAN, M. J., SPERELAKIS, N.:
Retention of fully differentiated electrophysiological properties of chick embryonic heart cells in culture.
Develop. Biol. 50, 134 - 141 (1976)
207. MERCER, E. N., DOWER, G. E.:
Normal and arrhythmic beating in isolated cultured heart cells and the effects of digoxin, quinidine and procainamide.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, 203 - 210 (1966)
208. MICHAEL, L., PITH, B. J. R., SCHWARTZ, A.:
Is pump stimulation associated with positive inotropy of the heart.
Science 200, 1287 - 1289 (1978)
209. MICHAEL, L., SCHWARTZ, A., WALLICK, E.:
Nature of the transport adenosine triphosphatase-digitalis complex: XIV . Inotropy and cardiac glycoside interaction with $Na^+-K^+-ATPase$ of isolated cat papillary muscles.
Mol. Pharmacol. 16, 135 - 146 (1979)
210. MOSES, R. L., KASTEN, F. H.:
Ultrastructure of dissociated adult mammalian myocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 161 - 172 (1979)
211. MURTHY, R. V., KIDWAI, A. M., DANIEL, E. E.:
Dissociation of $+$ contractile effect and binding and inhibition of $Na^+-K^+-adenosine$ triphosphatase by cardiac glycosides in rabbit myometrium.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 188, 575 - 581 (1974)
212. MUSTAFA, S. J., BERNE, R. M., RUBIO, R.:
Adenosine metabolism in cultured chick-embryo heart cells.
Am. J. Physiol. 228 (No. 5), 1474 - 1478 (1975)
213. NAKAO, M.:
Several topics concerning Na , K -ATPase.
Life Sci. 15, 1849 - 1859 (1975)
214. NAYLER, W., NOACK, E. A.:
Influence of cardiac glycosides on electrolyte exchange and content in cardiac muscle cells.
In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/I, "Cardiac Glycosides". Herausgeber: K. Greef; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 407 - 436 (1981)
215. NEES, S., GERBES, A. L., GERLACH, E.:
Isolation, identification and continuous culture of coronary endothelial cells from guinea pig hearts.
Europ. J. Cell. Biol. 24, 287 - 297 (1981)
216. NOACK, E., FELGENTRÄGER, J., ZETTNER, B.:
Changes in myocardial Na and K content during the development of cardiac glycoside inotropy.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 1189 - 1194 (1979)

217. NOBLE, D.:
Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides.
Cardiovasc. Res. 14, 495 - 514 (1980)
218. OKARMA, T. B., TRAMELL, P., KALMAN, S. M.:
The surface interactions between digoxin and cultured heart cells.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 559 - 576 (1972)
219. OKITA, G. T., RICHARDSON, F., ROTH-SCHECHTER, B. F.:
Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 185, 1 - 11 (1973)
220. OKITA, G. T.:
Dissociation of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition from digitalis inotropy.
Fed. Proc. 36, 2225 - 2230 (1977)
221. OKITA, G. T., MATLACK, M. A., JOHNSON, C.:
Instability of strophanthidin to alter ^{22}Na efflux and myocardial Na and K levels during initial stages of digitalis inotropy.
Pharmakol. Kongr. Paris, Abstr. 2286 p. 732 (1978)
222. ONJI, T., LIU, M. S.:
Ouabain receptor in isolated adult dog heart myocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 207, 148 - 156 (1981)
223. PERRONE, J. P., BLOSTEIN, R.:
Asymetric interaction of inside out and rightside-out erythrocyte membrane vesicles with ouabain.
Biochim. Biophys. Acta 291, 680 - 689 (1973)
224. PETERS, T., RABEN, R. H., WASSERMANN, O.:
Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase by ouabain, cassaine, and their alkylating derivatives.
Europ. J. Pharmacol. 26, 166 - 174 (1974)
225. POLLACK, L. R., TATE, E. H., COOK, J. S.:
Turnover and regulation of Na-K-ATPase in HeLa cells.
Am. J. Physiol. 241, 173 - 183 (1981)
226. PORZIG, H., BECKER, C., REUTER, H.:
Competitive and non competitive interactions between specific ligands and beta-adrenoreceptors in living cardiac cells.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 89 - 99 (1982)
227. POWELL, T., STURRIDGE, M. F., SUVARNA, S. K., TERRAR, D. A., TWIST, V. W.:
Intact individual heart cells isolated from human ventricular tissue:
Brit. Med. Journal 283, 1013 - 1015 (1981)
228. RENAUD, J. F.:
Use of cell cultures as a tool to elucidate physiological, pharmacological and biochemical membrane properties of the embryonic heart.
Biol. Cellulaire 37, 97 - 104 (1980)

229. REPKE, K., PORTIUS, H. J.:
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptor
Experientia 19, 452 - 458 (1963)
230. REPKE, K.:
Metabolism of cardiac glycosides. New aspects of cardiac glycosides - III.
Oxford: Pergamon Press 47 - 73 (1964)
231. REPKE, K., EST, M., PORTIUS, H. J.:
Über die Ursache der Speziesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit.
Biochem. Pharmacol. 14, 1785 - 1802 (1965)
232. REUTER, H.:
Exchange of calcium in mammalian myocardium. Mechanism and physiological significance.
Circ. Res. 34, 599 - 605 (1974)
233. REUTER, H.:
Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs.
Nature 301, 569 - 574 (1983)
234. RHEE, H. M., DUTTA, S., MARKS, B. H.:
Cardiac NaK ATPase activity during positive inotropic and toxic action of ouabain.
Europ. J. Pharmacol. 37, 141 - 153 (1976)
235. RHEE, H. M., HUANG, W. H., ASKARI, A.:
Relationship between the positive inotropic effect of ouabain and its inhibitory effects on (Na^+K^+) -ATPase and active transport of Rb^+ in the dog heart.
Europ. J. Pharmacol. 70, 273 - 278 (1981)
236. ROMANOFF, A. L.:
The avian embryo.
In: *The heart*; McMillan Press Ed., New York, Chapter 9, 681 - 780 (1960)
237. RUOHO, A., KYTE, J.:
Photoaffinity labeling of the ouabain binding site on (Na^+K^+) adenosine triphosphatase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 123 - 143 (1974)
238. SANDRITTER, W.:
Vortrag im Rahmen des "8th Intern. Meeting of the International Study Group for Research in Cardiac Metabolism", Tokyo, Mai 1976
239. SCATCHARD, G.:
The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)
240. SCHANNE, O. F., BKAILY, G.:
Explanted cardiac cells: A model to study drug actions?
Can. J. Physiol. Pharmacol. 59, 443 - 467 (1981)
241. SCHATZMANN, H. J.:
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran.
Helv. Physiol. Acta 11, 346 - 354 (1953)

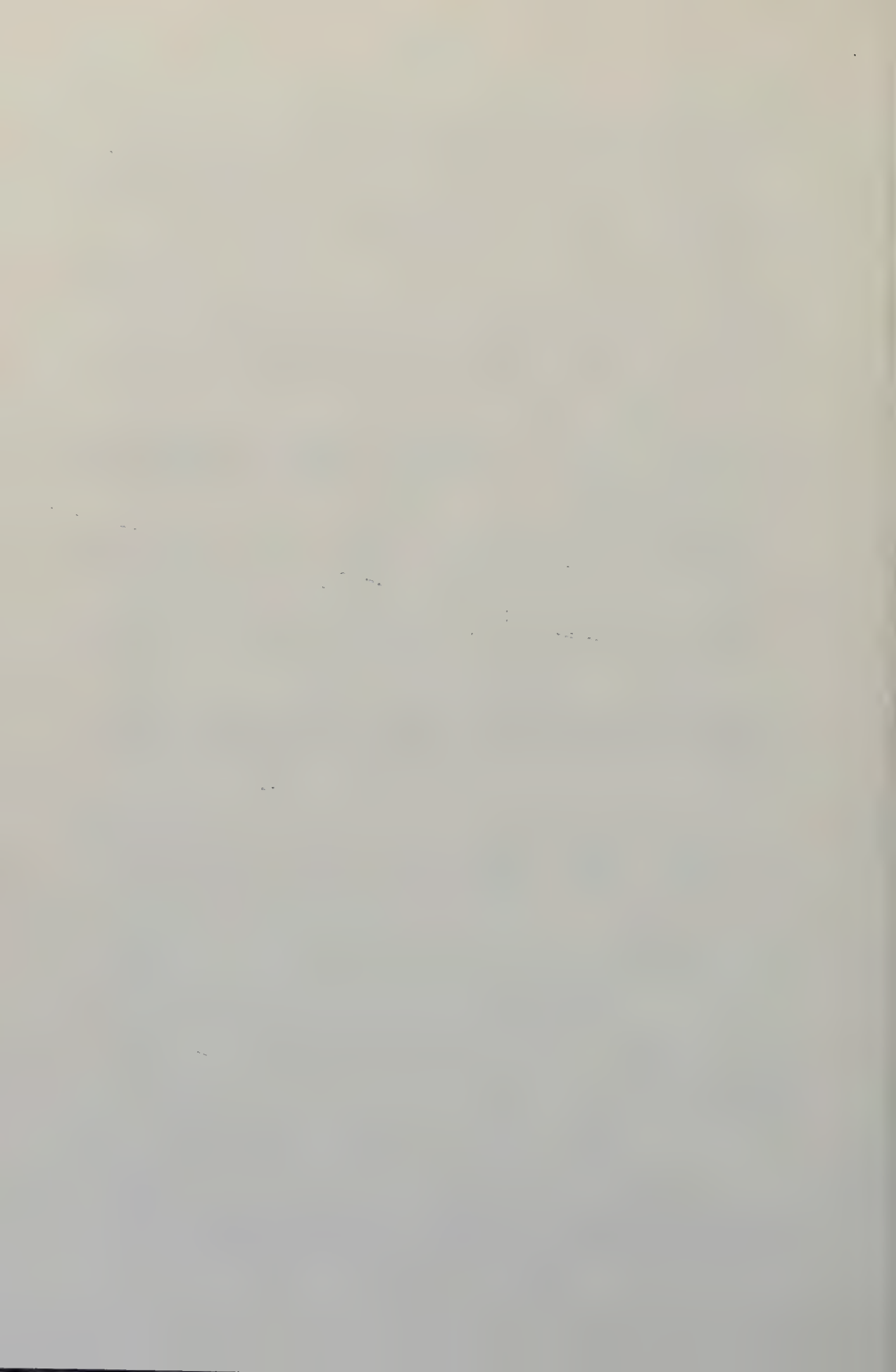
242. SCHONER, W., v. ILBERG, C., KRAMER, R., SEUBERT, W.:
On the mechanism of Na^+ - and K^+ stimulated hydrolysis of adenosine triphosphatase. 1. Purification and properties of a Na^+ - K^+ -activated ATPase from ox brain.
Europ. J. Biochem. 1, 334 - 343 (1967)
243. SCHONER, W.:
Zum aktiven Na^+ , K^+ -Transport durch die Membran tierischer Zellen.
Angew. Chemie 83, 947 - 955 (1971)
244. SCHÖNFELD, W., SCHÖN, R., MENKE, K. H., REPKE, K. R. H.:
Identification of conformational states of transport ATPase by kinetic analysis of ouabain binding.
Acta Biol. Med. Germ. 28, 935 - 956 (1972)
245. SCHWARTZ, A., ALLEN, J. C., v. WINKLE, W. B., MANSON, R.:
Further studies on the correlation between the inotropic action of ouabain and its interaction with the Na^+ , K^+ adenosine triphosphatase: isolated perfused rabbit and cat hearts.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 191, 119 - 127 (1974)
246. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G. E., ALLEN, J. C.:
The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects.
Pharmacol. Rev. 27, 3 - 134 (1975)
247. SCHWARTZ, A.:
Sodium-potassium adenosine triphosphatase - a receptor for digitalis?
Biochem. Pharmacol. 25, 237 - 239 (1976)
248. SCHWARTZ, A.:
Is the red cell membrane Na^+ , K^+ -ATPase enzyme system the pharmacological receptor for digitalis?
Circ. Res. 39, 2 - 7 (1976)
249. SCHWENK, H., WIEDMANN, T., REMMER, H.:
Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, 340 - 344 (1981)
250. SEGAL, J., SCHWARTZ, H., GORDON, A.:
The effect of triiodothyronine on 2-deoxy-D-(1- ^3H)glucose uptake in cultured chick embryo heart cells.
Endocrinology 101, 143 - 149 (1977)
251. SHERIDAN, D. J.:
Effects of ouabain on contraction and superficially bound calcium in neonatal and adult cardiac muscle.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 1123 - 1130 (1978)
252. SIMPSON, P., MC GRATH, M., SAVION, S.:
Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines.
Circ. Res. 51, 787 - 801 (1982)
253. SKOU, J. C.:
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta 23, 349 - 401 (1957)

254. SKOU, J. C.:
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell-membranes.
Physiol. Rev. 45, 596 - 617 (1965)
255. SKOU, J. C.:
The relationship of the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membranes.
Bioenergetics 4, 1 - 30 (1973)
256. SMITH, T. W., BARRY, W. H., MARSH, J. D., LORELL, B.:
Hypoxia, calcium fluxes and inotropic state: Studies in cultured heart cells.
Am. Heart J. 103, 716 - 723 (1982)
257. SMITH, T. W., KIM, D., BARRY, W. H.:
Studies of the inotropic mechanisms of cardiac glycosides in cultured heart cells.
Supplement to Bas. Res. Cardiol. 79, 140 - 146 (1984)
258. SMULYAN, H., EICH, R. H.:
Effect of digitalis on skeletal muscle in man.
Am. J. Card. 37, 716 - 723 (1976)
259. SMYTHIES, J. R., BRADLEY, R. J.:
Receptors in pharmacology
New York, Basel: Marcel Dekker (1978)
260. SPERELAKIS, N., LEHMKUHL, D.:
Insensitivity of cultured chick heart cells to autonomic agents and tetrodotoxin.
Am. J. Physiol. 209, 693 - 698 (1965)
261. SPERELAKIS, N., LEE, E. C.:
Characterization of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase isolated from embryonic chick hearts and cultured chick heart cells.
Biochim. Biophys. Acta 233, 562 - 579 (1971)
262. SPERELAKIS, N.:
The electrical properties of embryonic heart cells.
In: Electrical phenomena in the heart; herausgegeben von W. C. De Mello. New York Academic Press 1 - 61 (1972)
263. SPERELAKIS, N., SHIGENOBU, K.:
Changes in membrane properties of chick embryonic hearts during development
J. Gen. Physiol. 60, 430 - 453 (1972)
264. SPERELAKIS, N., SHIGENOBU, K., MC LEAN, M. J.:
Membrane cation channels - Changes in developing hearts, in cell culture, and in organ culture.
In: Developmental and physiological correlates of cardiac cells. (M. Liebermann, T. Sano eds.), 209 - 234, Raven Press, New York (1976)
265. SPERELAKIS, N.:
Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology.
Environ. Health Perspect. 26, 243 - 267 (1978)
266. SWEANDER, K. J.:
Two molecular forms of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -stimulated ATPase in brain.
J. Biol. Chem. 254, 6060 - 6067 (1979)

267. TANIGUCHI, K., IIDA, S.:
Two apparently different ouabain binding sites of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.
Biochim. Biophys. Acta 288, 98 - 102 (1972)
268. TANIGUCHI, K., IIDA, S.:
The effect of phospholipids on the apparent activation energy of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.
Biochim. Biophys. Acta 274, 536 - 541 (1972)
269. TOBIN, T., BRODY, T. M.:
Rates of dissociation of enzyme-ouabain complexes and $K_{0.5}$ values in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-adenosine triphosphatase}$ from different species.
Biochem. Pharmacol. 21, 1553 - 1560 (1972)
270. TOBIN, T., HENDERSON, R., SEN, A. K.:
Species and tissue differences in the rate of dissociation of ouabain from $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.
Biochim. Biophys. Acta 274, 551 - 555 (1972)
271. VASALLE, M., LEE, C. O.:
The relationship among intracellular sodium activity, calcium, and strophanthidin inotropy in canine cardiac purkinje fibres.
J. Gen. Physiol. 83, 287 - 307 (1984)
272. VAUGHAN, G. L., COOK, J. S.:
Regeneration of cation-transport capacity in HeLa cell membranes after specific blockade by ouabain
Proc. Nat. Acad. Sci 69, 2649 - 2653 (1972)
273. VIGNE, P., FRELIN, C., LAZDUNSKI, M.:
Ontogeny of the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ during chick skeletal myogenesis.
J. Biol. Chem. 257, 5380 - 5384 (1982)
274. WAKABAYASHI, S., GOSHIMA, K.:
Comparison of kinetic characteristics of $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ exchange in sarcolemma vesicles and cultured cells from chick heart.
Biochim. Biophys. Acta 645, 311 - 317 (1981)
275. WALLICK, E. T., SCHWARTZ, A.:
Thermodynamics of the rate of binding of ouabain to the sodium potassium adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 249, 5141 - 5147 (1974)
276. WARBANOW, W.:
The effect of prostaglandins E_1 and F_2a upon the mechanical activity of isolated rat heart muscle cells in culture.
Acta. Biol. Med. Germ. 35, 1167 - 1168 (1976)
277. WARBANOW, W.:
Die mechanische Aktivität kultivierter Herzzellen. Physiologische und pharmakologische Untersuchungen. Dissertation zur Promotion B und Erlangung des akad. Grades Dr. sc. med.; Berlin-Buch 1980
278. WASSERSTRÖM, J. A., SCHWARTZ, D. J., FOZZARD, H. A.:
Relation between intracellular sodium and twitch tension in sheep cardiac purkinje strands exposed to cardiac glycosides
Circ. Res. 52, 697 - 705 (1983)

279. WEINGART, R., KASS, R. S., TSIEN, R. W.:
Is digitalis inotropy associated with enhanced slow inward calcium current?
Nature 273, 389 - 401 (1978)
280. WELLSMITH, N. Y., LINDENMAYER, G. E.:
Two receptor forms for ouabain in sarcolemma-enriched preparations from canine ventricle.
Circ. Res. 47, 710 - 720 (1980)
281. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOSIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Effects of vanadate in cultured rat heart cells. Vanadate transport, intracellular binding and vanadate induced changes in beating and in active cation flux.
Biochim. Biophys. Acta 597, 364 - 383 (1980)
282. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., FISCHER, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H.:
Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta 687, 79 - 93 (1982)
283. WERDAN, K., ZWISSLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Characterization of specific binding sites for cardiac glycosides in cultured rat heart cells not involved in inhibition of the sodium pump.
Europ. J. Cell. Biol. 27, 33 (1982)
284. WERDAN, K., ZWISSLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Quantitative correlation of cardiac glycoside binding to its receptor and inhibition of the sodium pump in chicken heart cells in culture.
Biochem. Pharmacol. 32, 757 - 760 (1983)
285. WERDAN, K.:
Herzglykosid-Rezeptoren der intakten Herzmuskelzelle - Eigenschaften und deren experimentelle Beeinflussung. Habilitationsschrift zur Erlangung des Grades eines habilitierten Doktors der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1984)
286. WERDAN, K., REITHMANN, Ch., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Chronic exposure to toxic but not to "therapeutic" concentrations of ouabain increases cardiac glycoside receptors in cardiac muscle cells from chicken embryos.
Biochem. Pharmacol. 33, 2337 - 2340 (1984)
287. WERDAN, K., SCHNEIDER, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Chronic exposure to low K^+ increases cardiac glycoside receptors in cultured cardiac cells: different responses of cardiac muscle and non muscle cells from chicken embryos.
Biochem. Pharmacol. 33, 1161 - 1164 (1984)
288. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISSLER, B., BROWN, L., ERDMANN, E.:
Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - I. Characterization of one single class of high affinity receptors in heart muscle cells from chicken embryos.
Biochem. Pharmacol. 33, 55 - 70 (1984)

289. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISSLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - II. Characterization of a high affinity and a low affinity binding site in heart muscle cells from neonatal rats.
Biochem. Pharmacol. 33, 1873 - 1886 (1984)
290. WERDAN, K., ZWISSLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Cardiac glycoside binding sites in cultured heart muscle cells.
Suppl. to Bas. Res. Cardiol. 79, 35 - 43 (1984)
291. WILL, P. C., LONGWORTH, J. W., BRAKE, E. T., COOK, J. S.:
Analysis of intracellular drug (ouabain) sequestration as a mechanism of detoxification.
Mol. Pharmacol. 13, 161 - 171 (1977)
292. WITHERING, W.:
An account of the foxglove and some of its medical uses with practical remarks on dropsy, and other diseases.
Birmingham 1785
293. WOLLENBERGER, A.:
Rhythmic and arrhythmic contractile activity of single myocardial cells cultured in vitro.
Circ. Res. 14/15 (Suppl. II) 184 - 201 (1964)
294. WOOD, J. M., SCHWARTZ, A.:
Effects of ouabain on calcium-45 flux in guinea pig cardiac tissue.
J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 137 - 144 (1978)
295. YAMAMOTO, S., AKERA, T., BRODY, T. M.:
Sodium influx rate and ouabain - sensitive rubidium uptake in isolated guinea pig atria.
Biochim. Biophys. Acta 555, 270 - 284 (1979)



DANKSAGUNG

Großen Dank schulde ich meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. K. Werdan, sowie Herrn Prof. Dr. E. Erdmann, die mich in die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens eingewiesen haben und durch ständiges Interesse und wertvolle Anregungen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso möchte ich allen Mitgliedern des Forschungslabors von Prof. Dr. Erdmann danken, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben. Insbesondere Frau B. Walter und Frl. A. Thomschke waren mir durch ihre engagierte Mitarbeit eine unentbehrliche Hilfe.

Die Untersuchungen an Herzzell-Membranpräparationen kultivierter Herzzellen entstanden in enger Zusammenarbeit mit Dr. L. Brown aus unserem Labor. Ihm sei dafür an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

LEBENS LAUF

Am 4. April 1960 wurde ich in München als Sohn des Rechtsanwaltes Dr. jur. T. Zwißler und seiner Ehefrau Eleonore Zwißler, geb. Müller, geboren.

1966 - 1970 Volksschule in Kreßbronn a. Bodensee

1970 - 1973 Willstätter-Gymnasium in Nürnberg

1973 - 1978 Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting

1978 Abitur

1978 - 1984 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1980 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung

1981 - 1984 Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, Labor Prof. Dr. Erdmann

1983 - 1984 Im Rahmen des Praktischen Jahres Ausbildung an der Medizinischen Klinik I und dem Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik München-Großhadern sowie der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Neuperlach

Okt. 1984 Ablegen des 3. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Seit. Jan. 1985 arbeite ich als wehrpflichtiger Stabsarzt an der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr in München.

